



PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

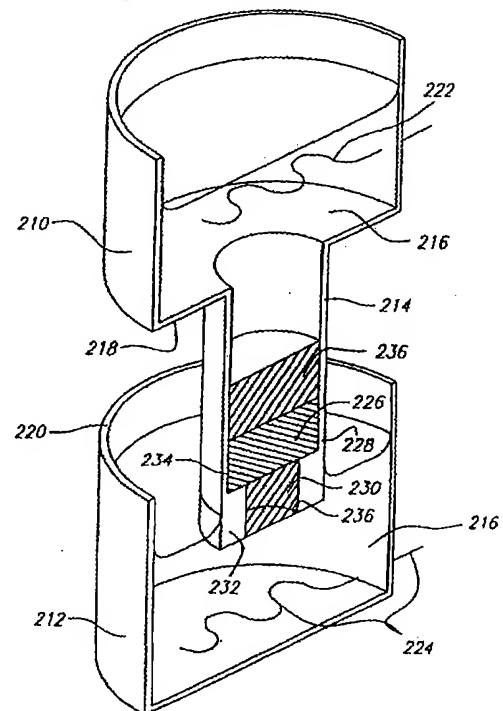
## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 6 : <b>G01N 27/447</b>	<b>A1</b>	(11) International Publication Number: <b>WO 98/10277</b>
		(43) International Publication Date: 12 March 1998 (12.03.98)
(21) International Application Number: <b>PCT/US97/13525</b>	(81) Designated States: AU, BR, CA, CN, JP, KR, NZ, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) International Filing Date: 31 July 1997 (31.07.97)		
(30) Priority Data: 08/709,358 6 September 1996 (06.09.96) US	<b>Published</b> <i>With international search report.</i>	
(71) Applicant: NANOGEN, INC. [US/US]; 10398 Pacific Center Court, San Diego, CA 92121 (US).		
(72) Inventors: SHELDON, Edward, L., III; 12515 Birch Bluff Place, San Diego, CA 92131 (US). JACKSON, Thomas, R.; 7135 Olivetas Avenue, La Jolla, CA 92037 (US). SWANSON, Paul, D.; 10291 Bell Gardens #8, Santee, CA 92071 (US). SCOTT, Bradley, S.; 7556 Charmant Drive #1734, San Diego, CA 92122 (US). HELLER, Michael, J.; 1614 Hawk View Drive, Encinitas, CA 92024 (US).		
(74) Agents: MURPHY, David, B. et al.; Lyon & Lyon LLP, Suite 4700, 633 West Fifth Street, Los Angeles, CA 90071-2066 (US).		

(54) Title: APPARATUS AND METHODS FOR ACTIVE BIOLOGICAL SAMPLE PREPARATION

## (57) Abstract

Systems and methods for the electronic sample preparation of biological materials utilize the differential charge-to-mass ratio and/or the differential affinity of sample constituents to separation materials for sample preparation. An integrated system is provided for performing some or all of the processes of: receipt of biological materials, cell selection, sample purification, sample concentration, buffer exchange, complexity reduction and/or diagnosis and analysis. In one embodiment, one or more sample chambers adapted to receive a buffer solution are formed adjacent to a spacer region which may include a trap or other affinity material, electrophoretic motion of the materials to be prepared being effected through operation of electrodes. In another aspect of this invention, a transporter or dipstick serves to collect and permit transport of materials, such as nucleic acids, most preferably DNA and/or RNA. In one embodiment, a membrane or trap is held in a frame which is adapted to mate with a channel formed in the spacer region. In another aspect of this invention, an electrophoretic system for biological sample preparation is operated in a manner so as to utilize the differential charge-to-mass ratio so as to control the migration of materials within the solution. In one aspect, bunching of selected materials is achieved by operation of two electrodes in a manner so as to reduce the spatial dispersion of those materials. In another aspect of this invention, a vertically disposed sample preparation unit includes an upper reservoir and a collection chamber. A sample is preferably pre-prepared and densified, applied to the conductive polymer, electrophoresed so as to move nucleic acids into the conductive polymer and move undesired material away from the conductive polymer. Integrated systems are described in which cell separation, purification, complexity reduction and diagnosis may be performed together. In the preferred embodiment, cell separation and sample purification are performed in a first region, the steps of denaturation, complexity reduction and diagnosis being performed in a second region.



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号  
特表2001-500966  
(P2001-500966A)

(43)公表日 平成13年1月23日(2001.1.23)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

G 0 1 N 27/447

識別記号

F I

G 0 1 N 27/26

テーマコード(参考)

3 2 5 E

3 1 5 D

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 70 頁)

(21)出願番号 特願平10-512651  
(86) (22)出願日 平成9年7月31日(1997.7.31)  
(85)翻訳文提出日 平成11年3月8日(1999.3.8)  
(86)国際出願番号 PCT/US97/13525  
(87)国際公開番号 WO98/10277  
(87)国際公開日 平成10年3月12日(1998.3.12)  
(31)優先権主張番号 08/709, 358  
(32)優先日 平成8年9月6日(1996.9.6)  
(33)優先権主張国 米国 (US)  
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L U, MC, NL, PT, SE), AU, BR, CA, C N, JP, KR, NZ

(71)出願人 ナノゲン・インコーポレイテッド  
アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、パシフィック・センター・コート10398番  
(72)発明者 シェルドン, エドワード・エル・ザ・サード  
アメリカ合衆国92131カリフォルニア州サンディエゴ、バーチ・ブラフ・プレイス12515番  
(72)発明者 ジャクソン, トーマス・アール  
アメリカ合衆国92037カリフォルニア州ラ・ホラ、オリベタス・アベニュー7135番  
(74)代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 活性生物学的試料調製用の装置および方法

#### (57)【要約】

生物学的物質の電気的試料調製用のシステムおよび方法は、試料調製につき、異なる電荷-質量比および/または分離物質に対する試料成分の異なる親和性を利用する。集積システムを、生物学的物質の受入、細胞選択、試料精製、試料濃縮、緩衝液交換、複雑度低減および/または診断および解析のプロセスのいくつかまたは全てを行なうのに供する。1つの具体例において、緩衝液を受けるように適合させた1以上の試料チャンパーを、トラップまたは他の親和性物質を含むことができるスペーサー領域に隣接して形成し、調製されるべき物質の電気泳動的運動は電極の操作により影響される。本発明のもう1つの態様において、トランスポーターまたはディップスティック (dipstick) が働いて、核酸、最も詳しくはDNAおよび/またはRNAのごとき物質の輸送を収集し、可能にする。1つの具体例において、膜またはトラップを該スペーサー領域に形成したチャンネルに合致するように適合させたフレームに収容する。本発明のもう1つの具体例において、生物学的試料調製用の電気泳動システムを、該溶液内の物質の移動を制御するように異

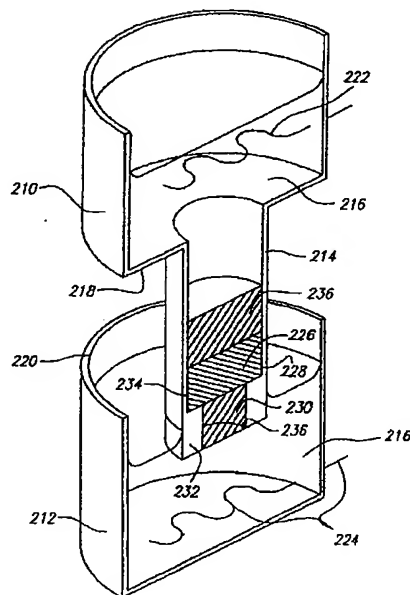


FIG. 13

## 【特許請求の範囲】

1. 緩衝液を受けるように適合させた第一試料チャンバー、  
緩衝液を受けるように適合させた第二試料チャンバー、  
目的の物質—対—非目的の物質に対して異なる効果を有するトラップを供する第一試料チャンバーおよび第二試料チャンバー間に配置されたスペーサー領域、  
第一試料チャンバー内にある場合の緩衝液と電気的に接触するように適合した第一電極、および  
第二試料チャンバー内にある場合の緩衝液と電気的に接触するように適合した第二電極を含むことを特徴とする、非目的の物質から目的の物質を分離するように適合した活性生物学的試料調製用装置。
2. 該トラップが疎水性である活性生物学的試料調製用の請求項1記載の装置。
3. 該トラップがタンパク質トラップである活性生物学的試料調製用の請求項1記載の装置。
4. 該タンパク質トラップがP V D Fである請求項3記載の装置。
5. 該タンパク質トラップがニトロセルロースである請求項3記載の装置。
6. 該トラップがD N Aトラップである活性生物学的試料調製用の請求項1記載の装置。
7. 該トラップが該装置から取り外し可能な活性生物学的試料調製用の請求項1記載の装置。
8. さらに、該トラップを含むように適合させたフレームを含む請求項7記載の装置。
9. 該トラップを該スペーサー領域に合致するように適合させた活性生物学的試料調製用の請求項1記載の装置。
10. 該トラップが該トラップに対して基部側にある第三電極を含む請求項1記載の装置。
11. 前方の電極および該トラップが、金属コートしたフィルター物質を含む活性生物学的試料調製用の請求項10記載の装置。

12. さらに、1以上の試料チャンバー内に配置した灰化用電極 (incineratorelectrode) を含む請求項1記載の装置。
13. さらに、該電極群に操作可能に連結した対照システムを含む活性生物学的試料調製用の請求項1記載の装置。
14. 該スパーサー領域が、第一試料チャンバーの容積の50%未満の容積を有する活性生物学的試料調製用の請求項1記載の装置。
15. 該スパーサー領域が、第一試料チャンバーの容積の30%以下の容積を有する活性生物学的試料調製用の請求項14記載の装置。
16. 該スパーサー領域の容積が、第一試料チャンバーの容積の25%以下である活性生物学的試料調製用の請求項15記載の装置。
17. 該試料チャンバーの厚さが第一電極および第二電極間の距離の20%以下である活性生物学的試料調製用の請求項1記載の装置。
18. 該試料チャンバーの厚さが第一電極および第二電極間の距離の10%以下である活性生物学的試料調製用の請求項17記載の装置。
19. 該試料チャンバーの厚さが第一電極および第二電極間の距離の5%以下である活性生物学的試料調製用の請求項18記載の装置。
20. 該試料領域の幅が5mm以下である活性生物学的試料調製用の請求項1記載の装置。
21. 試料チャンバーの厚さが4mm以下である活性生物学的試料調製用の請求項20記載の装置。
22. 該試料チャンバーの厚さが約1ないし約2mmである活性生物学的試料調製用の請求項21記載の装置。
23. さらに、第一試料チャンバーおよび第一電極間の保護層を含み、それにより第一電極チャンバーを形成する活性生物学的試料調製用の請求項1記載の装置。
24. 該保護層が膜である活性生物学的試料調製用の請求項23記載の装置。
25. 該膜が限外濾過膜である活性生物学的試料調製用の請求項24記載の装置。

26. 該膜が酢酸セルロース膜である活性生物学的試料調製用の請求項24記載の装置。

27. 第一電極チャンバーの容積が該試料チャンバーの容積の少なくとも10倍である請求項26記載の装置。

28. 第一試料チャンバーを該スパーサー領域上に垂直に配置させる活性生物学的試料調製用の請求項1記載の装置。

29. 異なる電荷-質量比を有する目的の物質および非目的の物質を含む物質を収集することを含み、溶液相領域および非目的の物質と比較して目的の物質に対して異なる効果を有する少なくとも1つのトラップ領域を含む電気分解システムで分離が達成される、試料の活性生物学的試料調製方法であって、

該デバイスの第一溶液相領域に該試料物質を供し、

該システム内で試料を電気泳動して、目的の物質および非目的の物質間の正味の異なる移動を行ない、それにより、目的のまたは非目的の物質の一方をトラップ内に位置させ、かつ他方の物質を溶液相領域位置させ、

該システムから目的の物質を取り出し、それにより比較的精製された目的の物質が調製される；

工程を含む該調製方法。

30. 該トラップが特異的細胞を選択的に捕獲する請求項29記載の方法。

31. 該目的の物質が細胞特異的トラップから溶出される請求項30記載の方法。

32. 該トラップがタンパク質を捕獲し、DNAおよびRNAの少なくとも一方を通過させるように働く請求項29記載の方法。

33. 該トラップがDNAおよびRNAの少なくとも一方を捕獲するように働く請求項29記載の方法。

34. DNAまたはRNAの少なくとも一部が該トラップと接触した後、該トラップからそれらを反発させる程度に電位が溶液相領域中の物質に適用される請求

項33記載の方法。

35. 該試料が該トラップに接触するより前に流体領域を通して先ず電気泳動的に輸送される活性生物学的試料調製用の請求項29記載の方法。
36. 該目的の物質を該トラップ内に位置させる活性生物学的試料調製用の請求項35記載の方法。
37. 該目的の物質およびトラップがシステムから取り出される活性生物学的試料調製用の請求項36記載の方法。
38. 該トラップがディップスティックである活性生物学的試料調製用の請求項37記載の方法。
39. 該目的の物質が該トラップから取り出される活性生物学的試料調製用の請求項36記載の方法。
40. 該目的の物質がトラップから流体領域へと取り出される活性生物学的試料調製用の請求項39記載の方法。
41. 該流体領域が該第一溶液相領域である活性生物学的試料調製用の請求項39記載の方法。
42. 該流体領域が第二流体領域である活性生物学的試料調製用の請求項39記載の方法。
43. 該非目的の物質をトラップ内に位置させる活性生物学的試料調製用の請求項35記載の方法。
44. 該目的の物質が流体によってシステムから取り出される活性生物学的試料調製用の請求項43記載の方法。
45. 該非目的の物質がトラップ内に捕獲されるより前に、該トラップを通して目的の物質を電気泳動する活性生物学的試料調製用の請求項43記載の方法。
46. 該試料をトラップに直ぐ隣接した第一流体領域の最初に配置する活性生物学的試料調製用の請求項29記載の方法。
47. 該デバイスの第一溶液相領域に該試料物質を供するより前に、該試料をプロテイナーゼ工程に付す活性生物学的試料調製用の請求項29記載の方法。
48. 該目的の物質を該トラップに保持し、該非目的の物質をトラップを通して第二流体領域へと電気泳動する活性生物学的試料調製用の請求項46記載の方法。

。

49. 該非目的の物質をトラップを通して電気泳動した後に、該目的の物質をトラップから溶出する活性生物学的試料調製用の請求項48記載の方法。

50. 該目的の物質を第二流体領域内へ溶出する活性生物学的試料調製用の請求項49記載の方法。

51. 該試料を濃縮工程に付す活性生物学的試料調製用の請求項29記載の方法

。

52. さらに、該試料をプロテイナーゼに付す工程を含む活性生物学的試料調製用の請求項29および51記載の方法。

53. 溶液相領域を有する電気泳動システムにおいて非目的の荷電生物学的物質

から目的の荷電生物学的物質を選択的に単離する方法であって、

第二電極よりも第一電極に比較的近い目的の荷電物質の運動を加速するように第一電極に反発電位を適用し、次いで

第一電極よりも第二電極に比較的近い目的の荷電物質の運動を減速するように第二電極に反発電位を適用し、

それによって、第一および第二電極間の目的の荷電物質の空間的分布を低下させる工程；

を含む該方法。

54. 該目的の物質がDNA、RNAおよびタンパク質の少なくとも一つである請求項53記載の方法。

55. 該目的の物質の空間的分布を低下させた後、第一電極の反発電位を増大させる請求項53記載の方法。

56. 電気泳動システム内の高分子核酸の収集用および核酸輸送用装置であって

、

収集領域内に配置された第一収集物質、

該収集領域に接する支持部材、

核酸の収集および輸送用の集積構造を供する収集物質支持部材を含む該装置。

57. 該高分子核酸がDNAである請求項56記載の装置。
58. 該高分子核酸がRNAである請求項56記載の装置。
59. キャリアー装置が係合に合致するフレームの2つの半体を含む請求項56記載の装置。
60. 該試料物質が層状物質である請求項56記載の装置。
61. 物質の活性生物学的試料調製用システムであって、  
インプット、  
少なくとも第一電気泳動溶液領域ならびに第一および第二電気泳動電極を含む精製チャンバー、  
第一電気泳動溶液相領域内のタンパク質トラップ領域、  
精製領域に連結したタップ、  
精製領域からタップのアウトプットを受け取るのに適合した変性領域、  
変性領域のアウトプットを受け取るのに適合した複雑度低減領域、および  
複雑度低減領域のアウトプットを受け取るのに適合した診断領域を含む該システム。
62. さらに、該インプットおよび精製領域間に配置された細胞分離領域を含む請求項61記載のシステム。
63. 細胞膜破壊用のエレクトロポレーション、沸騰、試薬の添加および剛直構造を有する試料の振動よりなる群から選択される方法によって細胞分離を行う請求項62記載のシステム。
64. さらに、タップに隣接して配置させ、精製チャンバーからタップまで物質を移動するように適合させた第三電極を含む請求項61記載の装置。
65. 該電極がC形電極である請求項64記載の装置。
66. 該電極が第一および第二電極によって規定された軸に対して斜めの方向に略配置された第一および第二部分および該トラップの方へ物質を駆動するために配置した第三部分を含む請求項64記載の装置。
67. 荷電生物学的高分子の電気泳動的運動用のシステムであって、



第一方向と同一方向の成分を有する方向への該電荷生物学的高分子の運動を引き起こすための第一バンチング電極領域、

該第一方向と反対の成分を有する該第一方向と反対の部分に有する方向への該電荷生物学的高分子の運動を引き起こすための第二バンチング電極領域、

該第一方向に略垂直である成分を有する方向への該電荷生物学的高分子の運動を引き起こすための第二電極領域、および

該電極領域を活性化して該電荷生物学的高分子の濃度および正味の移動を行なうための電氣的制御システム；

を含む該システム。

68. 第一バンチング電極領域、第二バンチング電極領域および第三バンチング電極領域がC形電極を形成する請求項67記載の電荷生物学的高分子の電気泳動移動用システム。

69. 当該DNAの荷電-質量比より大きい比を有するタンパク質様物質を含有する試料からDNAを精製するためのデバイスであって、該デバイスが、

緩衝液の受け取りに適合する上流貯蔵器であって、DNAおよびタンパク質様物質の受け取り用の試料溶液受け取り領域を含む該上流貯蔵器、

該上流容器の試料溶液受け取り領域に隣接して、かつ垂直にその下に配置した導電性ポリマー領域、

緩衝液およびDNAの受け取りに適合させた収集チャンバー、および

該導電性ポリマーおよび収集チャンバーを通る該DNAおよびタンパク質様物質の電気泳動運動を供する該緩衝液に電氣的に接触するように適合させた電極

を含むことを特徴とする該デバイス。

70. さらに、該収集チャンバーの少なくとも一部を規定する膜を含むDNA精製の請求項69記載の装置。

71. 該膜が限外濾過膜であるDNA精製の請求項70記載のデバイス。

72. 該膜が分子量カットオフメンブレインを有するDNA精製の請求項70記載のデバイス。

73. 分子量カットオフメンブレインが該収集チャンバー内にDNAを保持するDNA精製の請求項72記載のデバイス。

74. 該収集チャンバーが導電性ポリマーの体積より小さい容積を有するDNA精製の請求項69記載のデバイス。

75. 該収集チャンバー容積が導電性ポリマーの体積の半分以下である請求項74記載のデバイス。

76. 該収集チャンバー容積が導電性ポリマーの体積の1/3以下であるDNA精製の請求項75記載のデバイス。

77. さらに、該導電性ポリマーおよび該収集チャンバー間に膜を含むDNA精製の請求項69記載のデバイス。

78. 該膜が、該膜を通してDNAおよびタンパク質様物質の両方の輸送を行なう細孔サイズを有するDNA精製の請求項77記載のデバイス。

79. さらに、緩衝液を受け取るのに適合し、かつ該収集チャンバーの下に配置

した下部貯蔵器を含むDNA精製の請求項69記載のデバイス。

80. 該導電性ポリマーがモレキュラーシープである請求項69記載のデバイス。

81. 該モレキュラーシープがアクリルアミドである請求項80記載のデバイス。

82. さらに、緩衝剤を含む請求項69記載のデバイス。

83. 該緩衝剤がヒスチジンである請求項82記載のデバイス。

84. 該導電性ポリマーが、移動方向に実質的に10ないし20mmの厚さを有する請求項69記載のデバイス。

85. 上流緩衝液チャンバー、該上流緩衝液チャンバーの下に配置された導電性ポリマー領域、該導電性ポリマー領域に隣接して配置された収集チャンバー、および当該システムを通る荷電物質の電気泳動的運動のために連結された電極を有するデバイスにおいて、DNAおよび該DNAよりも高い電荷-質量比を有する特定の物質を含む他の荷電物質を含む試料混合物からDNAを精製する方法であって、

該導電性ポリマー上方の上流チャンバー中に該試料混合物を入れ、

該電極を活性化して、該非目的の物質を実質的に該導電性ポリマー領域までずっと移動させるのに十分な時間、該試料混合物を該導電性ポリマー領域へと電気泳動し、次いで

該DNAを該収集チャンバーへ溶出する；

工程を含む該方法。

86．さらに、該試料混合液の濃縮工程を含む、試料混合物からDNAを精製する請求項85記載の方法。

87．該濃縮工程がスクロースの添加を含む、試料混合物からDNAを精製する請求項85記載の方法。

88．該上流緩衝液チャンバーに試料混合物を入れるより前に、細胞を溶解するさらなる工程を含む、試料混合物からDNAを精製する請求項85記載の方法。

89．該上流緩衝液チャンバーに試料混合物を入れるより前に、試料を剪断するさらなる工程を含む、試料混合物からDNAを精製する請求項85記載の方法。

90．該試料混合物をプロテイナーゼに付す、試料混合物からDNAを精製する請求項85記載の方法。

91．該プロテイナーゼ工程より前に、該試料混合物をRNAse工程に付す、試料混合物からDNAを精製する請求項90記載の方法。

92．該プロテイナーゼがプロテイナーゼKである請求項91記載の方法。

93．該収集チャンバー内にDNAを溶出する工程より前に、さらに、該緩衝液を交換する工程を含む、試料混合物からDNAを精製する請求項85記載の方法。

94．該収集チャンバー内にDNAを溶出するより前に、さらに、該収集チャンバーへ膜を加える工程を含む、試料混合物からDNAを精製する請求項85記載の方法。

95．該収集チャンバーからDNAを抽出する工程を含む、試料混合物からDNAを精製する請求項85記載の方法。

96. 該収集チャンバーに穴をあけることによってDNAを該収集チャンバーから抽出する、試料混合物からDNAを精製する請求項95記載の方法。

97. 該DNAをバルブを通して該収集チャンバーから抽出する、試料混合物からDNAを精製する請求項95記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

### 活性生物学的試料調製用の装置および方法

#### 発明の分野

本発明は活性、多段的分子的生物学的試料調製および診断解析を行なうためのデバイスおよび方法に関する。より詳しくは、本発明は試料調製、細胞選択、生物学的試料精製、複雑度低減、生物学的診断および一般的な試料調製および取扱いに関する。

#### 発明の背景

分子生物学は核酸およびタンパク質の解析に関する広範な種類の技術を含む。これらの技術のおよび手順の多くは臨床的診断アッセイおよび試験の基礎を形成する。これらの技術は核酸ハイブリダイゼーション解析、制限酵素解析、遺伝子配列解析、および核酸およびタンパク質の分離および精製を含む(例えば、[J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989] を参照)。

これらの技術のほとんどは、大量の数の試料につき数多くの操作(例えば、ピペティング、遠心、電気泳動)を行なうことを含む。それらはしばしば複雑で時間がかかり、一般的に高度な精度を必要とする。多くの技術は、感度、特異性または再現性の欠如によってその適用が制限される。例えば、これらの問題は核酸ハイブリダイゼーション解析の多くの診断的適用を制限してきた。

遺伝的および感染性疾患のためのDNAハイブリダイゼーションを行なう完全プロセスは非常に複雑である。大まかに言えば、該完全プロセスを多数の工程および分割工程に分割することができる。遺伝病診断の場合、第一工程は該試料(例えば、血液または組織)を得ることに関係する。試料のタイプに依存して、種々の予備処理が行なわれるであろう。第二の工程は該細胞を粉碎または溶解し、次いでそれが粗DNAおよびRNA(簡単のため、以下の本文中DNAの参照は、適切な場合にはRNAも参照する)物質を他の細胞成分と共に放出することに関

係する。一般的に、細胞夾雑物の除去および粗ライゼートのさらなる精製のためにいくつかの分割工程が必要である。この点において、いくつかのオプションがさらなるプロセッシングおよび解析のために存在する。1つのオプションは該精製試料DNAを変性することおよび多くのフォーマット（ドットプロット、マイクロビーズ、マイクロタイタープレート等）のうちの一つで直接ハイブリダイゼーション解析を行なうことを含む。サザンプロットハイブリダイゼーションと呼ばれる第二のオプションは、制限酵素でDNAを切断し、該DNAフラグメントを電気泳動ゲル上で分離し、メンブレインフィルターにプロットし、次いで、該プロットを特異的DNAプローブ配列と共にハイブリダイズすることを含む。この手順は該遺伝子DNAの複雑度を効果的に低減し、それによってハイブリダイゼーション特異性および感度の向上を助ける。残念ながら、この手順は長く、困難である。第三のオプションはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）または他の増幅手順を行うことである。該PCR手順は標的DNA配列の数を増幅（増大）させる。標的DNAの増幅は、遺伝子DNAまたはRNAの解析における複雑さおよび感度に関する問題の克服を助ける。これらの手順は全て時間がかかり比較的複雑であって、診断試験のコストを著しく増やす。これらの試料調製およびDN S Aプロセッシング工程の後、実際ハイブリダイゼーション反応を行なう。最後に、検出およびデータ解析が該ハイブリダイゼーションイベントを解析結果に変換する。

試料調製およびプロセッシングの工程は典型的にハイブリダイゼーションおよび検出ならびに解析の他の主工程と分離して、それらから離れて行なわれてきた。実際に、試料調製およびDNAプロセッシングを含む種々の分割工程はしばしば他の分割工程から分離され、離れた別々の操作として行なわれてきた。これらの分割工程をより詳細に考慮すると、全血、組織または他の生物学的流体試料を得ることのごときいずれかの多くの手段により得られてきた。血液の場合、該試料をしばしば加工して、赤血球を除去し、目的の有核（白血球）細胞を保持する。通常、このプロセスは密度勾配遠心によって行なわれる。次いで、細胞破碎または溶解を、好ましくは超音波照射、凍結／解凍によってか、または溶解試薬の添加

によって行なう。

一定の場合において、該血液を大規模に加工して不純物を除去する。先行技術で知られているそのようなシステムの一つはQiagenシステムである。このシステムは先ず溶解、引き続きプロテイナーゼKでの消化を含み、その後、該試料をカラム上に負荷し、次いで、高塩緩衝液（例えば、1.25M NaCl）で溶出する。該試料をイソプロパノールでの沈殿によって濃縮し、次いで、遠心してペレットを形成する。次いで、該ペレットをエタノールで洗浄し、遠心し、その後、それを目的の緩衝液に入れる。総精製時間は約2時間より長く、製造者は1.7ないし1.9の光学密度比（260nm/280nm）（OD260-280）を主張する。高塩濃度は該調製物質に対する一定の酵素反応が起こることを排除する。さらに、Qiagen法によって調製したDNAは、自由場電気泳動を用いた電気泳動診断システム上で比較的少ない輸送を有する。

さて、試料調製の一般的考察に話を戻すと、粗DNAをしばしば遠心工程によって該細胞夾雑物から分離する。ハイブリダイゼーションの前に、二本鎖DNAを変性して一本鎖型にする。該二本鎖DNAの変性は一般的に、加熱(>T<sub>m</sub>)、塩濃度変化、塩基（例えば、NaOH）または変性剤（例えば、尿素、ホルムアミド）の添加を含む技術によって行なわれてきた。研究者らは、電気化学的セル中でDNAをその一本鎖型に変性することを示唆してきた。理論は、電極の表面においてDNAへ電子移動があつて、それが二本鎖構造を効率的に弱め、ストランドの分離をもたらす。例えば、[Stanley, "DNA Denaturation by an Electric Potential", U.K. patent application 2,247,889 published March 18, 1992] を参照。

一般的に、核酸ハイブリダイゼーション解析は、比較的大量の非標的核酸の複合体の中から非常に少数の特異的標的核酸（DNAまたはRNA）の過剰なプローブDNAでの検出を含む。DNA複雑度は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いた標的核酸配列の増幅によって、時にはある程度克服される。（[M. A. Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, 1990] を参照。）増幅は、その後の直接プローブハイブリダイゼーション

工程を向上する莫大な数の標的核酸配列をもたらしつつ、増幅は、典型的に他の工程と比較して無比な状態で行なわれるべき冗長な、扱い難い手順を含む。複雑で比較的大きな装置が増幅工程を行なうのに必要である。

実際ハイブリダイゼーション反応は重要な工程を代表し、プロセスの終わり付近に現れる。該ハイブリダイゼーション工程は、該標的DNA配列に対してハイブリダイゼーションを起こすための一組の最適条件において、該調製DNA試料を特異的レポータープローブに暴露することを含む。ハイブリダイゼーションを多数のフォーマットのいずれか一つで行なうことができる。例えば、多重試料核酸ハイブリダイゼーション解析を種々のフィルターおよび固体支持体フォーマット上で行なうことができる ([G. A. Beltz et al., in *Methods in Enzymology*, vol.100, Part B, R. Wu, L. Grossman, K. Moldave, Eds., Academic Press New York, Chapter 19, pp. 266-308, 1985]を参照)。一つのフォーマット、いわゆる「ドットプロット」ハイブリダイゼーションは、フィルターへの標的DNAの非共有結合を含み、引き続いてそれを放射性同位体ラベル化プローブとハイブリダイズする。「ドットプロット」ハイブリダイゼーションは広範囲に及び使用され、多くの変形が開発された ([M. L. M. Anderson, and B. D. Young, in *Nucleic Acid Hybridization-A Practical Approach*, B. D. Hames and S. J. Higgins, Eds., IRL Press, Washington, D. C. Chapter 4, pp.73-111, 1985]を参照)。遺伝子突然変異の多重解析 [D. Nanibhushan and D. Rabin, in EPA0228 075, July 8, 1987] のためおよびオーバーラップクロンの検出および遺伝子マップの構築 [G. A. Evans, in US Patent Number 5,219,726, June 15, 1993] のため、「ドットプロット」アッセイが開発されてきた。

新たな技術が、マイクロフォーマット化マルチプレックスまたはマトリクスデバイス (例えば、DNAチップ) 上での多重試料核酸ハイブリダイゼーション解析を行なうために開発されている ([M. Barinaga, 253 *Science*, pp. 1489, 1991; W. Bains, 10 *Bio/Technology*, pp. 757-758, 1992] を参照)。通常、これらの方法はDNAチップのマイクロウェルのごとき固体支持体の非常に小さな特異的エリアに特異的DNAを接触させる。これらのハイブリダイゼーションフォーマット



トは在来の「ドットプロット」および「サンドウィッチ」ハイブリダイゼーションシステムのマイクロスケール変形である。

該マイクロフォーマット化ハイブリダイゼーションを用いて「ハイブリダイゼーションによる配列決定」(SBH)を行なうことができる([M. Barinaga, 253 Science, pp. 1489, 1991; W. Bains, 10 Bio/Technology, pp. 757-758, 1992]を参照)。SBHは全ての可能性のある $n$ -ヌクレオチドオリゴマー( $n$ -マー)を使用して未知のDNA試料中の $n$ -マーを同定し、引き続いてそれをアルゴリズム解析によって配列させて該DNA配列をもたらし[R. Drmanac and R. Crkvenjakov, Yugoslav Patent Application #570/87, 1987; R. Drmanac et al., 4 Genomics, 114, 1989; Strezoska et al., 88 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 10089, 1992; and R. Drmanac and R. B. Crkvenjakov, U.S. Patent #5,202,231, April 13, 1993]。

SBHを行なうのに2つのフォーマットがある。第一のフォーマットは、支持体上に全ての可能性のある $n$ -マーのアレイを作製し、次いでそれを該標的配列とハイブリダイズすることを含む。第二のフォーマットは標的配列を支持体に接触させ、それを全ての可能性のある $n$ -マーで連続的にプローブ化することを含む。両方のフォーマットは、直接プローブハイブリダイゼーションの基本的な問題および多重ハイブリダイゼーションに関するさらなる困難を有する。

サザーン [United Kingdom Patent Application GB 8810400, 1988; E. M. Southern et al., 13 Genomics 1008, 1992] は、DNAを解析または配列決定のために第一のフォーマットを用いることを提唱した。サザーンはPCR増幅遺伝子DNAを用いて既知の単一点変異を同定した。サザーンはSBH用の固体支持体上にオリゴヌクレオチドのアレイを合成するための方法も記載した。しかしながら、サザーンはアレイ上の各オリゴヌクレオチドにつき最適化緊縮条件をいかに達成するかには取り組まなかった。

同時に、Drmanacら [260 Science 1649-1652, 1993] は第二のフォーマットを用いていくつかの短い(116 bp) DNA配列を配列決定した。標的DNAを膜支持体(「ドットプロット」フォーマット)に接触させた。各フィルターを27

2のラベル化した10-マーおよび11-マーオリゴヌクレオチドと連続的にハイブリダイズした。広範囲の緊縮条件を用いて、各n-マープローブにつき特異的ハイブリダイゼーションを達成した；洗浄時間は5分ないし一晩と変化し、温度は0℃ないし16℃と変化した。ほとんどのプローブが16℃にて3時間の洗浄を必要とした。ハイブリダイゼーション信号を検出するために、該フィルターを2ないし18時間暴露しなければならなかった。単純な標的配列、オリゴマープローブの減少した組および可能な最っとも緊縮な条件にも関わらず、全見かけ上のプラスハイブリダイゼーション率は5%であった。

ハイブリダイゼーションイベントの検出および解析のための多種の方法が存在する。該DNAプローブをラベル化するのに使用するリポーター基（蛍光発色団、酵素、放射能同位体等）に依存して、検出および解析を蛍光分析的に、比色分析的に、またはオートラジオグラフィーによって行なう。蛍光放射または粒子発光のごとき発光放射を観察および測定することによって、該ハイブリダイゼーションイベントに関する情報を得ることができる。検出方法が非常に高い固有感度を有している場合でさえも、非特異的結合物質のバックグラウンドでの存在のため、ハイブリダイゼーションイベントの検出は困難である。多くの他の要因もDNAハイブリダイゼーションアッセイの感度および選択性を低減する。

一定のプロセッシング工程または分割工程と一緒にまとめる試みがなされてきた。例えば、種々のマイクロロボットシステムが、支持体材料上にDNAプローブのアレイを調製するのに提唱されてきた。例えば、Beattieら [The 1992 San Diego Conference: Genetic Recognition, November, 1992] は、マイクロロボットシステムを用いて特異的DNA配列を含有するマイクロドロップレットをガラス基板上の個々のマイクロ加工試料ウェル中に置いた。単一チップまたは基板上に形成された集積システムを記載する種々の試みがなされてきており、ここには全試料調製および診断システムの多重の工程が含まれるであろう。例えば、A. Manzら ["Miniaturized Total Chemical Analysis System: A Novel Concept For Chemical Sensing", Sensors And Actuators, B1(1990), pp. 244-248] は、ミニチュア化総合化学的解析システムのモジュール構築体を含む「総合化学的解析システム(T

AS)]を記載している。サンプリング、試料輸送、いずれの必要な化学反応、クロマトグラフィー分離ならびに検出を自動的行なうことができた。さらにもう1つの提唱された集積システムは [Stapleton, U.S. Patent No. 5,451,500] であって、それは、複数の生物学的試料が2次元フォーマット中にキャリアーを含有するマトリックス中に個別に取込まれる、標的核酸配列の自動検出のシステムを記載している。異なるタイプのキャリアーを異なる種類の診断試験または試験パネルにつき記載している。

生物学的試料調製および解析の複数の態様を行なうことを意図する種々の多重電極システムが開示される。Pace ["Silicon Semiconductor Wafer for Analyzing Micronic Biological Samples"と題されたU.S. Patent 4,908,112] は、キャピラリーサイズのコンジットをチャネルによって半導体デバイス中に形成し、ここに電極を該チャネル中に位置して該コンジットを通る液体の運動を活性化する分析用分離デバイスを記載している。Paceは該コンジットの横断寸法は $100\mu\text{m}$ より少ないと言明している。Paceは分析用機器の全ての機能：試料注入、試薬導入、精製、検出、信号調節回路、理論およびオンボード知能を単一のシリコンウェハー内に集積できると言明している。Soaneら [Method and Device for Moving Molecules by the Application of a Plurality of Electrical Fields"と題されたU.S. Patent 5,126,022] は、電極に電位を負荷することによって物質を溝を通して移動させることによるシステムであって、該媒体中を移動する、あるいは相補的成分、色素、蛍光タグ、放射能ラベル、酵素特異的タグまたは本質的に物理的または化学的のいずれかである種々の変換のごときいずれの数の目的に対する他のタイプの化学薬品との接触に向けて移動する所与の荷電粒子と反応性のある抗原-抗体で満たされた種々の溝へ選択した成分を導くことができる該システムを記載している。細菌性または哺乳動物の細胞、あるいはウィルスを、電極への電位の負荷による複雑な溝ネットワークによって分類することができると言われ、ここに、場の負荷による該細胞またはウィルスの溝ネットワークによる運動は、動いている特定の物質のサイズ、電荷または形状に基づく。Clark ["Sensor Devices"と題されたU.S. Patent 5,194,133] は、該液体が該チャネ

ルに沿って通過するときに該試料流体の分離を引き起こすためにスターチ、アガロース、アルギナート、カラギーナンまたはポリアクリルアミドゲルのごとき材料を含有する延びたマイクロマシーン化チャンネルが形成された表面に基質を含む試料流体の解析用センサーデバイスを開示している。該生物学的物質は、例えば、結合タンパク質、抗体、レクチン、酵素、酵素の配列または脂質を含むことができる。

DNAを種々の表面から溶出するための種々のデバイスが知られている。Shukla ["Appratus for Electroelution"と題されたU.S. Patent 5,340,449] は、電場中でポリアクリルアミド、アガロースのごとき固相マトリクス材料およびPVDFのごとき膜からのタンパク質、DNAおよびRNAのごとき高分子の溶出のためのシステムおよび方法を記載している。物質を該固相から一部分分子量カットオフメンブレインで規定されている体積中へ溶出する。Okano["Separation of Polynucleotides Using Supports Having a Plurality of Electrode-containing Cells"と題されたU.S. Patent 5,434,049] は、試料中の複数の標的ポリヌクレオチドを検出する方法を開示し、該方法は個々のチャンバーに電位を負荷して、捕獲した標的ポリヌクレオチドを溶出するための電極として働くようにし、次いで、該溶出物質を収集に利用するプロセスを含む。

一般的に、先行技術プロセスは極度に重労働であり、時間集約的であった。例えば、該PCR増幅プロセスは時間がかかり、該診断アッセイのコストを増大する。該プロセス中かまたはプロセス間のいずれかでヒトの介入を必要とする多重の工程は汚染および操作者過失の可能性があるということにおいて次善である。さらに、該個々のプロセスを行なうための複数のマシーンまたは複雑なロボットシステムの使用は、費用および物理的空間の必要の両方の意味から最大の研究所を除いてしばしば制限される。

上の考察から明らかなごとく、試料調製反応を遂行する効果的な技術を提供する数多くの試みがなされてきた。しかしながら、上記の理由から、これらの技術は制限され、欠如している。これらの種々のアプローチは完全DNA診断アッセイを行なうシステムを形成するのに、容易にまとまらない。そのようなシステムに

対する長期認識された必要に関わらず、満足する解決は以前には提唱されていなかった。

### 発明の概要

本発明は診断または解析におけるそれらの究極の使用につき、広く生物学的物質の電気的試料調製用の方法および装置に関する。集積システムを、生物学的物質の受入、細胞選択、試料精製、試料濃縮、緩衝液交換、複雑度低減および／または診断および解析のプロセスのいくつかまたは全てを行なうのに供する。細胞ライゼートのごとき粗混合物からのDNA、RNAまたは生物学的物質またはタンパク質のごとき、目的の成分の分離。電気的試料調製は、調製および分離の目的の試料中の種々の物質についての異なる移動度および／または異なる親和性を利用する。これらの方法および装置は、粗混合物またはライゼートからのDNAの自由場電気泳動精製につき、特に有用である。本発明の1つの態様において、デバイスは、少なくとも緩衝液を受けるように適合させた第一の中央または試料チャンバーおよび同一または異なる緩衝液を受けるように適合させた第二の中央または試料チャンバーを含み、ここに、該第一の試料チャンバーおよび該第二の試料チャンバーは、好ましくはトラップ、膜または他の親和性材料を含むスペーサー領域によって分けられる。該第一の試料チャンバーの導電性溶液と電気的接触する第一の電極および該第二の試料チャンバーの導電性溶液と電気的接触する第二の電極が供される。好ましくは、各電極はそれ自身の電極チャンバーに含有され、該電極チャンバーは、例えば限外濾過膜、ポリマーまたはゲルのごとき膜のような保護膜または分離媒体により、対応する試料チャンバーから分けられる。作動において、該試料混合物を該第一の中央チャンバーに入れる。該中央チャンバーは溶液(好ましくは50mM ヒスチジン、250mM HEPESまたは0.5×TBEのごとき低伝導率緩衝液)を含有する。生物学的物質(例えば、粗ライゼート)の混合物を該第一チャンバーに添加し、次いで、該電極を活性化する。電場中で移動度を持つ物質は、該物質の電荷に依存して一つの電極またはもう一つの電極に向けて移動する。1つの具体例において、目的のまたは同電荷を持つ非目的の物質を、該第二のチャンバーに置かれた目的の物質と反対電荷でバイア

ス電極に引寄せらる。従って、同電荷の目的の物質および非目的の物質は該第一および第二のチャンバー間にある親和性物質に向けて移動する。

1つの具体例において、該試料混合物は、いくつかは電荷を有する非目的の物質と混合された電荷を有する目的の物質からなる。該電極を活性化した後、該目的の物質を、反対電荷でバイアスされた電極が置かれ、該親和性材料に結合する該第二のチャンバーに向けて進む。対照的に、同電荷の非目的の物質は該反対電荷でバイアスした電極に向けて移動し、該第二のチャンバーまで該親和性材料を通過する。反対電荷を持つ他の非目的の物質は該第一チャンバー中の電極に向かって引寄せられる。該非目的の物質が該親和性材料を通過した後、両方のチャンバー中の該電解溶液を交換して該非目的の物質を除去することができる。次いで、目的の物質を新鮮な電解溶液に溶出する。一定のまたは増加電流における連続的電気泳動によってか、あるいは該親和性材料からの溶出を引起す洗浄剤、塩、塩基または酸のごとき化学薬品の添加によって溶出を達成する。加えて、温度変化を該目的の物質の溶出に使用し得るであろう。

1つの特定の具体例において、該親和性材料は、該試料中の目的の物質の（例えば、好ましくは50%、より好ましくは80%の）充分な部分を保持する充分な体積を持つゲルからなる。該ゲル組成および濃度を選び、高分子量（30、000ないし3、000、000ダルトン）を有する目的の物質の移動度を該ゲルによって遅滞し、低分子量（100ないし10、000ダルトン）を有する非目的の物質は比較的影響しないようにする。その結果、該ゲルは該非目的の物質の通過に必要とされるよりも長い期間の電気泳動後または高い電流でのみ目的の物質を放出する。その結果、該ゲルは該目的の物質のトラップであって、非目的の物質に対しては比較的重要なバリアーを供しない。該ゲルがトラップとして働くために、好ましくは、該目的の物質と非目的の物質とは、該ゲルを通して進む間の電気泳動移動度において非常に大きな差異を有する。好ましくは、該トラップは、同様の組成およびお互い実質的に10の係数以内の分子量を持つフラグメントの中の移動度の差異を効果的に分離しない。

本発明によると、急速な移動度の方が選ばれて、異なる分子量の分解能は好ん

で犠牲にされる。好ましくは、該デバイス中のゲルは移動の方向に対して比較的コンパクト（例えば、0.5ないし10mm）であって、急速な電気泳動輸送を可能にする。かくして、この技術の速度は、サイズにおいて非常に大きな差異を持つ物質間を除いて、サイズによる物質の在来分離に適合しない。その結果、非常に異なる分子量の目的物質が共精製されるであろうことは、この技術には本質的である。サイズは異なるが同様の組成の物質の調製は、例えば、生物の遺伝子の全部分または代表的な部分のクローニング目的での異なるサイズのDNAの精製において、使用者にとって有利であるかもしれない。

本発明の1つの態様によると、該目的物質を同一のデバイス内のゲルへ前進させ、また、そこから外に進ませる。すなわち、好ましい具体例において、全システム内の異なる領域はトラップとして働き、従って、分析物または溶出すべき物質の分離を助ける。電気泳動および溶出工程の集積は、また、時間の節約、必要な工程数の削減および該装置に対して必要な空間の量の低減において、使用者にとって重大な利点を供する。

本発明の1つの態様において、第一および第二の末端試料チャンバーと電氣的に連絡する多重電極チャンバーおよび1以上の中間試料チャンバーを含有するデバイスを有利に使用する。好ましい具体例において、各末端試料チャンバーおよび中間試料チャンバーまたはチャンバーは電極チャンバーと電氣的に連絡しており、好ましくは、該試料チャンバーを膜によって該電極チャンバーから分離する。好ましくは、該電極チャンバーは、該電極チャンバーに負荷する試料の体積よりも大きな、好ましくは、はるかに大きな（例えば、少なくとも10対1）緩衝体積を有する。

本発明のもう1つの態様において、該トラップ、膜または他の親和性材料はトランスポーターまたは「ディップスティック(dipstick)」として働いて物質の輸送を収集し、可能にする。このデバイスの1つの具体例において、試料チャンバーに隣接して間に配置された膜または親和性材料を構造的に完全な状態で供して該チャンバー構造からの該トラップまたは親和性材料の除去を可能にする。1つの好ましい具体例において、膜またはトラップを該スペーサー領域に形成したチ

ヤネルに合致するように適合させたフレームに収容する。該トランスポーターまたはディップスティックを利用して、さらなる精製、複雑度低減または分析もしくは診断のごときさらなるプロセッシングのために収集した物質を輸送することができる。所望により、該トランスポーターを電源に隣接して配置するか、あるいはそれと電氣的に連絡した状態で形成することができる。

本発明のさらにもう1つの態様において、第一および第二の電極を介在する試料溶液内に配置し、該システムは、さらに第一および第二の電極の間に第三の電極を含む。該第三の電極は対照電極として働いて該試料溶液内の荷電物質の流れを調節することができる。好ましくは、該第三の電極をグリッドとして形成し、膜上に金属コーティングをスパッタリングすることによって有利に形成することができる。好ましくは、該第三の電極またはグリッドを該試料溶液内で該第二の電極よりも該第一の電極により近く配置することができる。操作の1つの仕方において、試料を該第一および第三の電極の間の試料溶液中に入れ、該第二の電極に向かう第一の電荷の荷電物質の正味の移動のために、該第一および第二の電極をバイアスする。好ましくは、該第三またはグリッドを若干マイナスか中性にバイアスする。一旦、該目的のDNAまたは他の荷電物質が該第三の電極またはグリッドを通り抜けるかまたは通り越すかしたら、好ましくは、該第三の電極またはグリッドを相対的にマイナスにする。この増大した負性は該マイナスに荷電したDNAを該第二に向けて移動させ、依然として該第一電極および該第三のまたはグリッド電極の間に残留しているよりゆっくり移動する他のマイナス電荷物質を反発するように働く。

本発明のさらにもう1つの態様において、一組の電極を試料溶液内に置き、該試料溶液内に該荷電高分子の小集団をまとめて濃縮するように操作する。一つの電極をバイアスして他方の電極に向かう荷電高分子の運動を加速するようにし、他方の電極をバイアスして該電極間の領域のその電極に近い該荷電高分子の運動を遅滞するようにする。そのようなバンチングは該荷電高分子を該領域内に物理的に濃縮するように働く。

好ましい具体例において、「C」型電極を利用する。この構造は該C型電極によ



って凝縮された領域内に含有された物質をまとめ、ならびに該C型領域によって凝縮された領域の外部の同電荷物質を反発するように働く。さらに、該C型領域に含有される物質に側方（すなわち、該C型電極から離れる正味の流動方向に対して横方向または斜め方向）の力に付す。該C型電極は集積された連続電極であることができ、あるいは区分することもできる。パラボラ構造のごとき他の形状を有利に利用する。該C型領域を該領域内に目的のまたは標的物質を含むようにサイズを合わせて作る。

複雑度低減デバイスは、捕獲プローブを接触させた支持体材料、好ましくは、アガロース、アクリルアミドまたは他の導電性ポリマーのごときポリマーゲルを含む1以上のプローブエリアを含む。該支持体材料を電極に接するように形成して電気泳動誘引および該捕獲プローブと該標的物質とのハイブリダイゼーションを可能にする。該捕獲物質の電氣的溶出および電氣的緊縮制御を用いることができる。1つの具体例において、該複雑度低減デバイスをプリント回路板に合致するチャンバーとの組合わせから形成する。該チャンバーは、その中に該支持体材料を置いた経路部（via）を含む。好ましくは、該プリント回路板は同心円の経路部を含み、該支持体材料を包含するための連続空間を供する。この具体例において、ガスまたは他の反応生成物を該経路部を通じて放出することができる。ある程度、該ガスは一般的に、該経路部がポリマーで満たされるので該経路部に上昇しないからである。従って、これらのガスまたは他の反応生成物はDNAのごとき分析物と接触しに来ない。所望により、該複雑度低減システムはさらに、非目的の物質の誘引および／または廃棄用の廃棄領域を含むことができる。該廃棄領域は該導電性ポリマーを通じて電氣的に連絡する電極を含む。作動において、該複雑度低減デバイスは自由場電気泳動輸送を行なう。あるいは、該溶液と接触している非被覆電極を、非目的の物質の廃棄のために利用することができる。

本発明のさらにもう1つの態様において、DNAまたは他の核酸精製デバイスを供する。陰極とみなすことができる電極を含有する上部貯蔵部を緩衝液および試料溶液を受けるように適合させる。好ましくは、該上流貯蔵部は、該上流貯蔵部と流体連絡しているチューブを含み、該チューブは該上流貯蔵部の直径よりも

小さな内径を有する。該チューブは、少なくとも、該チューブ内にプラグまたはトラップ領域を供する第一異なる移動度セクション（好ましくはゲル）を含む。所望により、該ゲルを支持体膜の上部にキャストすることができる。収集チャンバーを該異なる移動度領域に隣接する。好ましい具体例において、該収集領域は該異なる移動度領域よりも小さな体積を有し、該試料体積よりも小さい。試料から収集へのサイズの縮小はDNAの体積濃度の増大を可能とし、該DNAを既知体積の該目的の緩衝液製剤中に交換する。陽極を下部貯蔵部に供する。本発明のさらにもう1つの態様において、DNAのフォーマットおよび輸送を垂直の代りに水平面上に置く。

作動において、試料を細胞溶解および予備調製工程の剪断に付す。好ましくは、次いで、プロテイナーゼKのごときプロテイナーゼの適用によるごとく、タンパク質のサイズを縮小する。好ましくは、該ユニットを垂直フォーマットで操作する場合、スクロースまたは他の濃縮剤を該試料に添加する。該濃縮剤は該第一異なる移動度セクションの直上の領域に試料を収集し、濃縮するように働く。次いで、濃縮剤を含む調製試料を該異なる移動度領域の該チューブ中の分離ユニット上に注入する。次いで、該陰極および陽極に電圧を印加して該システム内の荷電物質の電気泳動輸送を供し、それが比較的ゆっくり移動するDNAを保持しつつ、該縮小サイズタンパク物質が先ず該異なる分離媒体を通過することを引き起こし、ならびに該プロテイナーゼKまたは他のプラスに荷電した物質を該陰極に再移動させることをもたらす。所望量のタンパク質が該異なる移動度領域および支持体膜を通過することを可能とする充分な時間の後、該DNAを該異なる移動領域から該試料チャンバーに溶出する。所望により、該支持体膜を既に通過したタンパク質様物質の受けた該下部貯蔵部中の緩衝液を除去し、新たな緩衝液と置換することができ、所望により、溶出したDNAを該試料チャンバー内に保持するように働く膜で規定することができる。

本発明のさらにもう1つの態様において、該陰極および陽極電極を導電性の液体またはゲルまたはポリマーと通じて該試料と連絡しているが、電源または他の制御機器に内在している。流体ポートを通じて導通をなし、好ましくは該電極（貴

金属)は消耗デバイスの部分ではない。

細胞分離、精製、複雑度低減および診断の機能のいくつかまたは全てを含む集積システムを有利に形成することができる。ひとつの具体例において、精製チャンバーは入力および多重電極を含んで、電気泳動駆動力を該荷電物質に供給する。該試料インพุットポートおよび流出タップの間に配置されたタンパク質トラップは非目的のタンパク質または他の荷電高分子をトラップするように働く。代りの具体例において、タンパク質のごとき非目的の物質をサイズにおいて縮小するか、あるいはDNAのごとき目的の物質に比較してそれらの移動度の度合いを増大するように電荷を修飾する。次いで、さらなるプロセシングのための該物質を、複雑度低減および/または診断方法のごときさらなるプロセシングのためのトラップまたは他の輸送デバイスから除去する。該非目的の物質からの標的物質のこの分離を、該標的物質をより高純度の領域(例えば、純粋緩衝液)に導く電場を変更することによって達成する。電場の変更をC型電極または該標的の移動度の方向に都合良く影響する電極の新たな形状の活性化により実行し得る。

本発明のさらにもう1つの態様において、集積した試料調製、複雑度低減および診断システムを供する。入力領域はプロテイナーゼの使用によるごとく、サイズが縮小されたタンパク質を含む粗ライゼートを受ける。該物質はDNAトラップを通過し、そこでは、該DNAが該タンパク質よりも比較的ゆっくりと移動する。電気泳動的に該DNAの到着より先に、該タンパク質はタンパク質トラップに到着する。次いで、該DNAは収集領域に向けて該DNAトラップから出る。好ましくは、該収集領域は該DNAトラップの体積よりも小さく、好ましくは、50マイクロリッターのごとき該DNAトラップの体積よりも実質的に小さな体積を有している。この体積は該複雑度低減および診断領域と連絡する。本発明の1つの態様において、該デバイス内の流体輸送を該収集領域の両端に設けられた入力ポートによって達成する。これらの二重入力を緩衝液、エアスラグ (air-slug) または試薬のごときいずれの流体を受けるように適合する。供給またはポンプの操作の選択的操作によって、該収集領域内に含有される物質(例えば、実質的に精製されたDNA)を該領域から該複雑度低減デバイスへと推進することができ

る。エアスラグの利用によって、種々の液体をもう一方から分離することができる。入力液体またはガスの操作によって、水圧式または空気圧式のピストンは該デバイスの液体セクション内の物質を移動させるように働く。該物質を、該収集体積から該複雑度低減、該診断領域までのごとく、該システム全体を通して推進しつつ、該物質を反対方向（例えば、該複雑度低減領域から該濃縮領域）に移動させることができる。

従って、本発明の目的は生物学的試料調製に有用な試料調製システムを提供することにある。

その上、本発明のさらなる目的は生物学的物質または他の粗試料からのDNAの精製用システムを提供することにある。

その上、本発明のさらなる目的は異なる溶液相移動度および／または異なる親和性による目的の生物学的荷電高分子の分離精製用の方法を提供することにある。

#### 図面の簡単な説明

図1は、多重試料チャンバー、多重電極チャンバーデバイスの上部平面図である。

図2は、多重電極チャンバー、末端試料チャンバーおよび多重中間試料チャンバーを含むデバイスの上部平面図である。

図3は、本発明の1つの具体例の透視分解組立図である。

図4は、多重電極具体例の断面図である。

図5は、トラップ電極を含む多重電極具体例の断面図である。

図6は、グリッドまたは対照電極を含む多重電極構造の透視図である。

図7は、さらにバンチング電極を含む多重電極システムの透視図である。

図8は、集積試料調製および診断デバイスの1つの実行の平面図である。

図9は、もう1つの集積試料調製および診断デバイスの平面図である。

図10は、複雑度低減デバイスの透視断面図である。

図11は、複雑度低減デバイスの透視断面接写図である。

図12は、プリント回路板および複雑度低減チャンバーをお互いから分解した複雑度低減デバイスの透視図である。

図13は、垂直配列した試料調製デバイスの切離透視図である。

図14は、水平に集積された試料調製、複雑度低減、診断および廃棄デバイスの平面図を示す。

図14Aは、図14のA-A'線に沿った断面図を示す。

図15は、図13のデバイスによって精製したエス・アウレウス (*S. aureus*) 遺伝子DNAの存在下、先行技術Qiagen法と比較した時間の関数での標的DNA輸送のグラフである。

図16は、異なる緩衝液中での複雑度低減デバイスの操作を比較するグラフである。

図17は、種々の緩衝液につきプリント回路板ベースのデバイスと比較したマイクロエレクトロニクスデバイスの信号積算のグラフである。

図18は、輸送および電気洗浄後、および40  $\mu$ Lにつき無関係のヒトDNAの存在下におけるTexas Red Bodipy<sup>TM</sup>ラベル化レン鎖球菌の標的配列を用いた脱ハイブリダイゼーション後の特異的および非特異的プローブにつき測定した相対標的信号レベルのグラフである。

図19は、等モル濃度の非ラベル化相補DNAおよび無関係ヒトDNAの存在下におけるラベル化レン鎖球菌標的DNAのハイブリダイゼーションのグラフである。

#### 発明の詳細な説明

図1は本発明の1つの具体例の上平面図を示す。フレーム10は、第一中央または試料チャンバー12および第二中央または試料チャンバー14を支持する。該第一および第二の表示は任意であって逆転させてもよく、あるいは該チャンバーを左中央チャンバー12および右中央チャンバー14ということもできる。その左中央チャンバー12と右中央チャンバー14との間には、スペーサー領域16が配される。該スペーサー領域は、当該スペーサー領域16内のトラップ、膜、または他の親和性材料もしくは生物試料の比較識別用の物質を受けるように適合される。1つの態様において、該スペーサー領域16はスペーサーの領域16にキャストしたゲルで満たしてもよく、あるいは膜を配して当該スペーサー領域

6を被覆することもできる。左中央チャンバー12には第一電極チャンバー18が隣接する。該電極チャンバー18は、膜22、好ましくは限外濾過膜、最も好ましくは酢酸セルロース膜によって中央チャンバー12から分離される。同様に、右または第二電極チャンバー20も右中央チャンバー14に隣接して配され、膜24によって分離される。該膜22、24の機能は、試料物質またはその選択成分が電極26、28に直接接触するのを減少または防ぐことである。第一電極26および第二電極28は、各々、第一電極チャンバー18および第二電極チャンバー20と接触して配される。該電極は、好ましくは貴金属より形成され、最も特には白金より形成される。

好ましい具体例において、該フレーム10は、それと接触して入れる物質と非反応性である比較的剛直な支持体材料より形成される。望ましい材料には：ポリメタクリレート、プラスチック、ポリプロピレン(polypropylene)、ポリカーボネート、PTFE、TEFLON<sup>TM</sup>または他の非反応性物質が含まれる。一般的には、該フレーム材料は、試料物質と非反応性、非相互作用性または非結合性である。該フレーム10は、その領域内に、電極チャンバー18、20、中央チャンバー12、14およびスペーサー領域16を含めて形成することができる。1つの具体例において、該電極チャンバー18、20は0.4cm幅、0.6cm深さおよび5cm長（第一電極26と第二電極28との間の線に平行の方向）である。該中央チャンバー12、14は電極チャンバー18、20と同一の幅および深さを有し、1.5cm長である。該スペーサー領域16はチャンバー・コンポーネント12、14、18および20と同一の幅および深さを有し、0.4cm長である。一般的には、スペーサー領域16の容積は、中央チャンバー12、14の容積と比較して小さい。該スペーサー領域16の容積は、中央チャンバー12、14の容積の好ましくは50%未満、より好ましくは30%未満である。前記の具体例では、中央チャンバー12、14の容積のほぼ25%の容積を有するスペーサー領域16となる。別の尺度として、該スペーサー領域16は第一電極26から第二電極28に向けての向きに沿ったその距離によって特徴付けし得る。直線距離は、好ましくは5mm未満、より好ましくは4mm以下、およびしばしば1-2

mmの範囲である。なおもう1つの特徴付けにおいて、第一電極26と第二電極28との間の向きのスペーサー領域16の厚さは、第一電極26と第二電極28との間の距離と比較して短い。この長さは、好ましくは20%未満、より好ましくは10%未満であって、最も好ましくはほぼ5%未満である。好ましくは、該スペーサー領域16のサイズは、目的物質が単離し得るように、当該デバイスの他の構造に対して、非目的物質から目的物質を分離できるようなものである。

スペーサー領域16には、当該デバイス内の高分子を区別するように作用する材料が含まれる。1つのクラス材料には、タンパク質トラップ、すなわちPVDF、ニトロセルロースおよび疎水性材料のごとき材料が含まれるであろう。なおもう1つのクラス材料はマイナスに荷電した物質である。なお三番目のクラスの材料はプラスに荷電した物質である。修飾クラスの材料は、トラップと組合せた洗浄剤を使用し、それはDNAがトラップを通過させる。種々の他の界面活性剤、洗浄剤、およびトラップの機能を達成して材料の中を識別する物質を、当業者に知られているごとく使用することができる。DNA/RNAトラップには、低密度ポリマー(例えば、0.5-3%のアガロース、または5%-15%のアクリルアミド)およびPVDFが特に含まれるであろう。後者の物質は、DNAをある程度トラップする物質であるが、洗浄剤を添加することによってそこからDNAまたはRNAを選択的に溶離し得る物質である。

該電極チャンバー18、20および中央チャンバー12、14には緩衝液を満たす。好ましくは、該緩衝液は比較的低い伝導率の緩衝液である。該緩衝液の他の機能的特徴には：化学的に低い反応性、正味電荷を有しない両性イオンまたは両性電解質、が含まれ得る。(出典明示して本明細書の一部とみなす)本出願と同日に出願された“Methods and Materials for Optimization of Electronic Hybridization Reactions”なる標題の出願には、かかる技術がより十分に記載されている。DNAの分離に好適に許容し得る緩衝液の例には：ヒスチジン、特に約50ミリモルのヒスチジン、HEPESおよび0.5×TBEが含まれる。HEPESとは、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸である。TAEは、脱イオン水中でTAE(0.4Mトリス酢酸、0.1MEDT

A、0.2M氷酢酸、pH 8.4)を10対1に10×希釈することによって調製する。0.5×TBEは、脱イオン水中でTBE(0.89Mトリス-ホウ酸、0.89Mホウ酸、0.02M EDTA、pH 8.0)を20対1で希釈することによって調製する。

作動においては、試料は中央チャンバー12、14に入れるが、論じる目的で左中央チャンバー12と想定する。第一電極26と第二電極28とを通して電位を加えると、電極チャンバー18、20および中央チャンバー12、14を通して電流が流れる。試料中の荷電高分子は、スパーサー領域16に向けて、左中央チャンバー12を通過して電気泳動的に移動する。スパーサー領域16がタンパク質トラップを含む場合には、該DNAは該スパーサー領域16を通過して右中央チャンバー14に移動する。別法として、該スパーサー領域16がDNAを保持するように設計された物質を含む場合には、タンパク質および他の非目的物質は通すが、DNAは当該スパーサー領域16の左部分に残留し、そこからそれを溶離することができる。後者の作動様式においては、該DNAを溶離して左中央チャンバー12に戻す前に、左中央チャンバー12中の緩衝液を入れ替えることができる。

おおまかには、本発明の方法は、異なる荷電-質量比(differential charge-to-massratio)を有する目的物質および非目的物質を含む物質の収集を含む試料の活性生物試料の調製用に提供され、その分離は、溶液相領域と、非目的物質と比較して目的物質に対して異なる作用を有する少なくとも1つのトラップ領域とを含む電気泳動系において達成される。該トラップ領域の異なる作用とは、目的物質または非目的物質のいずれかを選択的に保持するか、または通すように選択される、当該トラップの物理的サイズ、組成および構造の機能である。好ましい具体例において、該方法には、該試料物質を当該デバイスの第一溶液相領域に供する工程が含まれる。その後、該試料を系内で電気泳動して、目的物質と非目的物質との間の正味異なる移動度に影響させ、それによって目的物質または非目的物質のうちの1をトラップ内に局在させ、もう1つの物質を溶液相領域中に局在させ、すなわち、(例えば、好ましくは $\geq 50\%$ 、より好ましくは $\geq 80\%$ の)



目的物質が該トラップに実質的に保持され、非目的物質は該トラップに実質的に保持されず、あるいはその逆かのいずれかとなる。その結果、目的物質を系から取出し、それによって比較的精製された目的物質が調製される。目的物質が結合またはトラップ物質である場合には、系からの物理学的な取出しに限定されるものではないが、ディップスティックにつづく流体もしくは他の媒質への取出しによるごとき、トラップを通しての移動、または特にチャンバー内が緩衝液で満たされている場合にはそれが出てきたチャンバーへ戻す移動によるごとき、いずれかの多くの方法でそれを取り出すことができる。

図2はマルチチャンバー配置の平面図を示す。フレーム30には複数の電極チャンバー32が含まれる。各電極チャンバー32には、電極34が含まれる。好ましくは該電極は、白金のごとき貴金属から形成され、電極チャンバー32内に入れた緩衝液と電氣的に接触して位置させ得る。末端の試料チャンバー36は、1またはそれを超える中間試料チャンバー38をサンドイッチする。末端の試料チャンバー36は、セパレーター40によって隣接する中間試料チャンバー38から分離される。該セパレーター40は、親和性媒体、膜、または種々の生物物質について通過もしくは親和性の間で選択的に識別する他の物質を含み得る。該試料チャンバー36、38は、膜42によって電極チャンバー32から分離される。好ましくは、電極チャンバー32の容積はより大きく、試料チャンバー36、38のサイズと対して好ましくは10倍であって、最も好ましくは20倍である。これは、膜42を通しての電気浸透が液体レベルの差異を生じ得るようにするためである。さらに、この比較的大きな容積比は、隣接する電極チャンバー32と試料チャンバー36、38との間のイオン濃度勾配を最小限にとどめ、かつpH安定性を増大させて、代って電気泳動的に作動する浸透の有害な作用が優勢になり始め、当該プロセスにマイナスの強い影響を与える始める前に、試料に対する作動時間および電力(V X I)入力を最適化する電極34の周りにより大きな緩衝能も付与する。比較的大きな電極チャンバー32のなごもう1つの目的は、泡が電極34で形成された後に、該泡が膜42に付着するのを防ぐように、チャンバー膜42と電極34との間に十分な空間的分離が存在することである。泡は膜を

妨害し、膜を通しての伝導を妨げるため、該泡が膜42と接触するのを避けるのが望ましく、該泡は高いpHを有し得る。さらに、電極34は、電極表面および固有標面核形成部位付近の局所電流密度を低下させることによって泡形成を最小限にとどめる、比較的大きな表面積、例えば5-20mm<sup>2</sup>を有することが望ましい。

フレーム30は、それと接触させて入れるべき物質と非反応性であるいずれの物質から形成することもできる。好ましくは、該物質は、定量の間のバックグラウンド・シグナルを最小限にとどめるために、380nmのUVで、および480nmと630nmとの間で低い自己蛍光を有するように選択される。該試料チャンバー36、38は異なるサイズとすることもできる。該試料チャンバー36、38は好ましくは300μL~3mLの範囲内、最も好ましくは1mLである。精製工程の後に、比較的精製された物質を試料容積において減少することができ、該容積は10マイクロリットルのオーダーまたはそれ未満とすることができる。

図3は、マルチチャンバーデバイスの斜視分解図を示す。フレーム50は、図2と関連して記載した機能およびサイズを有する、1またはそれを超える末端試料チャンバー56、試料チャンバー58および電極チャンバー52を、粉碎または成形のごときによって形成する。電極54は、好ましくは電極チャンバー52から出ている、当業者に知られているねじ込みコネクタのごときコネクタ86を介して接続される。隣接試料チャンバー56、58は、膜ホルダー60によって分離される。該膜ホルダー60は、所望により、コネクタ66を介して接続される二分の膜ホルダー62から形成されていてもよい。開口部64は該膜ホルダー66の中に存在する。膜ホルダー60中の開口部64は、膜または親和性物質のごとき生物物質の通過を識別または区別する物質を受けるように適合される。該膜ホルダー60は、ホルダー66と嵌合するように適合される。試料チャンバー56、58は、穴68を介して電極チャンバー52と連通して存在する。この具体例においては、雌ネジ74に受容される雄ネジ72によって、インサート部70がフレーム50とねじ込み嵌合される。円筒部76にはカウンターボア78が含まれ、穴部80が含まれており、電極チャンバー52から該穴部80を

通り該カウンターボア78を通して試料チャンバー56、58への通過が許容される。該インサート部70は、好ましくは当該インサート部70の雄ネジ末端の反対のリング82で終結し、そこで該リング82は当該リング82と電極チャンバー52のボア68との間でフィルターまたは膜84をサンドイッチするように適合される。該試料チャンバー56、58のサイズは、ケースによって変動し得る。さらに、種々の膜ホルダー60を使用しても、あるいは使用しなくてもよく、試料チャンバー56、58のサイズの決定においてなおさらなる程度の柔軟性が付与される。

膜ホルダー60はフレーム50から取り外し可能である。該膜ホルダー60には、オリゴヌクレオチドに共有結合した官能基を有する膜、メッシュまたはビーズが含まれ得る。膜ホルダー60の開口部64内に物質が捕獲された後に、該膜ホルダー60をフレーム50から取り外して、該物質を他の部位に運搬することができる。

図4は本発明の1つの具体例の断面図を示す。第一または左電極90および第二または右電極92は、溶液相領域94内で処理した荷電高分子に対して電気泳動力を供するように適合される。溶液相領域94は破線境界線で示され、その物理的境界線は本発明により達成すべき物質または方法と不一致でないいずれの望ましい支持媒質を介して形成することができる。トラップ96は、第二電極92の付近に、または実質的にそれを取り囲んで配される。該トラップ96は該物質から形成することができ、トラップまたはスパーサー物質について前記したごとき特質を有する。所望により、保護層または透過性層98を、溶液相領域94の少なくとも一部分と第一または右電極90との間に配することもできる。図4に示すごとく、該透過性層98は、溶液相領域94が左電極90と直接接触するのを遮断するように作用する。作動においては、該デバイスのポートまたは他の開口部を通すごとく、試料をインプット領域100に入れる。溶液相領域94は、溶液相について前記に説明した機能を含むか、または有する緩衝液または他の好適な輸送媒質が含まれる。インプット領域100に最初に入れられた試料は、電極90、92に電位を加えることによってトラップ96に向けて電気泳動的に移

動する。目的物質、例えばDNAがトラップ96と接触した場合には、新たにトラップされた物質を取出すように、該系が作動する。このことは、系からトラップ96を取出すか、またはトラップ96からトラップ物質を溶離して溶液相領域94に戻すことによって行い得た。好ましくは、溶液相領域94へのトラップ物質の溶離は、溶液相領域94中の溶液を新たな溶液で置き替えることに先行する。該溶液は以前に存在していたものと同一または異なるものとし得る。

図5は、本発明の別の1つの具体例の断面図を示す。第一電極110および第二電極112は、第一溶液相領域114および第二溶液相領域115内の荷電物質の全体的な電気泳動的移動を供する。該第一電極110は、所望により、荷電高分子と第一電極110との接触を最小限にとどめるように、当該第一電極110の付近か、またはそれを実質的に取り囲むように配される第一透過性層118を有していてもよい。第二層109は第二電極112の付近か、またはそれを実質的に取り囲むように形成される。1つのバージョンにおいて、該第二層109は、前記したトラップ、物質および官能基を含む。別法として、該第二層109は、第二電極112と直接接触することから荷電高分子を保護するように原則的に適合される第二透過性層をも含み得る。所望により、トラップ電極122は、第一電極110と第二電極112との間に位置し、溶液相領域を第一溶液相領域114と第二溶液相領域115とに分割してもよい。さらに、所望により、該トラップ電極122は当該トラップ電極122にか、またはそれと一体に形成されるトラップ116を含んでいてもよい。作動においては、試料はインプット領域120に供され、それは、第一電極110、第二電極112およびトラップ電極112を介して発生する電場の作用下にて荷電高分子の電気泳動的移動を引起こす。所望により、さらなる電極を溶液相領域114、115内に位置させてもよい。

図6は、第一電極130、第二電極132および制御電極134の斜視図を示す。一般的に、該第一電極130はカソードと、該第二電極132はアノードと同定することができるが、これらの用語は接続の極性に依存して相互変換し得る。該制御電極134は、所望によりそれを電極130、132に、最も好ましくは

カソード130により接近して位置させてもよいが、第一電極130と第二電極132との間に等距離の間隔を空けて位置させることができる。制御電極134に加える電位の変動を用いて、第一電極130と第二電極132との間の領域内の荷電高分子の流動を変調し得る。1つの作動の様式において、第一電極130、カソードおよび制御電極134の間に試料を入れる。マイナスに荷電した物質の正味の流動は、カソードからアノード(第二電極132)へである。制御電極134がDNAのごとき物質を中性、または僅かにマイナスでさえ、マイナスに荷電させる場合には、それはカソードからアノードへの向きで流動するであろう。DNAの目的画分が制御電極134を通過するか、またはその付近を通過すると、制御電極134はよりマイナスになり得、それによって第二電極132に向けてのDNAの移動を助け、制御電極134と第一電極130(カソード)との間に残留する非目的物質が排斥される。

図7は、バンチャー構造で有利に用いられる電極の斜視図を示す。第一電極140および第二電極142は、各々、(用語は逆転し得るが)カソードおよびアノードとして配置される。第一制御電極144および第二制御電極146は、該カソードとアノードとの間に配される。第一制御電極144と第二制御電極146との間の荷電高分子のバンチングは、第二制御電極146よりも第一制御電極144に比較的より近い荷電物質の通過の速度を加速するように、第一制御電極144に電位を加えることによって達成し得る。第二制御電極146は、第一制御電極144よりも第二制御電極146に比較的により近い荷電物質の速度を遅らせるように印加する。溶液相環境中の荷電高分子の拡散速度はチャンバー(例えば、第一電極140と第二電極142との間を規定する領域)を通しての通過時間に有意に匹敵するため、該バンチング・プロセスは目的の荷電物質をより小さな領域内に局在化させ、拡散の効果を打ち消すように作用する。1つの作動の様式において、目的量のDNAが第一制御電極144を通過すると、その制御電極はマイナスの電位に置かれ、マイナスに荷電した物質を第二電極142(アノード)にさらに向けさせる。図7は4-電極配置を示すが、前記したように電極の作用によって、バンチャーは図6の構造から形成し得る。

ひらたくいえば、本発明のこの態様は、溶液相領域を有する電気泳動系中で目的の荷電生物試料を非目的の荷電生物試料から選択的に単離するための方法を含み、該方法には、少なくとも、第二電極よりも第一電極に比較的により近い目的の荷電物質の移動を加速するように該第一電極に反発性の電位を加え、次いで、第一電極よりも第二電極に比較的により近い目的の荷電物質の移動を減速させるように第二電極に反発性の電位を加える工程が含まれる。かかる作動により、第一電極と第二電極との間の目的の電荷物質の空間的分布が減少される。

図8および9は、本発明の一体化試料調製系の平面図の2の実施態様を示す。簡便のため、図8および9中に一般的に同定される構造は、同一の参照番号で標識する。図8は、トラップ166がタンパク質トラップ領域162から下流に配された系を示す。図9は、タンパク質トラップ領域162がトラップ領域166の下流に存在する系を示す。

精製チャンバー150には、その末端に、第一電極152および第二電極154が配される。試料添加ポート156は、精製チャンバー150のインプット領域を含み得る。好ましくは、該試料添加ポート156は、(例えば、ルアーロック、フェイスシール、スライドシールのような)液体連続またはカバーシールを含む。所望により、該試料添加ポート156は、 $0.2\mu\text{m}$ フィルターのごときフィルターを含んでいてもよい。該フィルターは、所望により、残渣除去の機能を作用し、DNAの幾分かの剪断を供してもよく、これによって該DNAの粘度が低下するであろう。所望により、精製チャンバー150の1または両方の末端で膜158を使用することもでき、膜158の主要な機能は電極152、154から試料物質を単離することにある。所望により、(図8に示す)細胞分離領域160は、試料添加ポート156の下流の精製チャンバー150に形成されてもよい。タンパク質トラップ領域162は、精製チャンバー150内に配される。図8に示すごとく1つの具体例において、試料添加ポート156(および所望により含める場合には細胞分離領域160)とトラップ166との間にタンパク質トラップ領域162が配される。この選択は、診断用の目的物質がトラップすべきタンパク質物質よりもより高い電気泳動移動度を有する場合に原則的に選択する。別の作動の

様式には、タンパク質または他の物質に、目的物質、例えばDNAよりもより高い程度の移動度を有させる工程が含まれる。この作動の様式においては、図9に示すごときデバイスを用いることができ、非目的物質は、目的物質、例えばDNAが該トラップ166に到着する前に、該トラップ166を過ぎて精製チャンバー150を通して移動する。所望により、タンパク質トラップ領域162をトラップ166と第二電極154との間に含めてもよい。

電極164は、好ましくは精製チャンバー150を横切るトラップ166付近のポイントで精製チャンバー150内に配される。図9は、トラップ166の付近に、かつそれに対して対称に一般的に配される“C-型”電極165を示す。DNAバンドが“C”によって定義される領域を通過し、次いで該C-電極の偏倚をマイナス（-）に荷電させた場合、該C-型電極は当該“C”によって規定される空間内に含まれる該DNAまたは他の荷電物質を濃縮し、かつその領域内に該荷電物質を集束させるように作用し、一方さらに、非目的分子をC-領域の外側に排斥する。さらに、“C”の開口部と調和して位置する電極がプラス（+）電位に切り替えられた場合には、“C”でDNAの全体バンドが集束され、プラス電極の位置に向けた新たな方向に推進される。該C-型電極は、連続したC-型構造または分離したコンポーネントとして形成し得る種々の分割部材として考えることができる。第一および第二電極部165aは、第一電極152と第二電極154とを接続するラインに対して一般的には垂直に配される。これらの垂直電極165aは一般的にバンチング機能を提供するように作用する。側部電極部165bは該C-型領域内に含まれる荷電物質をトラップ166に向かわせる横方向または横に移動させる力を一般的に供する。

トラップ166は、精製チャンバー150から変性領域168へと導くチャンネルまたはチャンバーを含む。所望により、該変性は、抵抗ヒーター170を通してごとき加熱によってか、または他の様式もしくは当業者に知られている方法によって行うことができ、それには、限定されるものではないが：DNA鎖を切断するのに十分な他の形態のエネルギー入力または当該技術分野で知られている他の化学的方法が含まれる。好ましい具体例において、該トラップ166の幅は1

00ミクロンよりも大きく、最も好ましくは1mmのオーダーである。一般的に、媒質は小さい表面積対体積比を有するのが望ましく、好ましい具体例では、デバイスの壁に対する試料または他の物質の非特異的な結合につき表面積の量を小さくする。該トラップ166は、複雑度低減チャンバー172に通じている。複雑度低減チャンバーの一例は、図10-12に関連して後記する。所望により、バルブ174を該コンプレキシティーレダクションチャンバー172と診断アッセイ部176との間に配してもよい。好ましい具体例において、該診断アッセイ部176は、前記の関連出願情報のセクションで同定した種々の出願に記載されているタイプのアクティブ・プログラマブル・マトリックス電気デバイスを含む。所望により、処理路178を廃棄チャンバーに連結してもよい。

図10、11および12は、複雑度低減デバイスの1つの具体例を示す。該デバイス180には、プリント回路基板182およびその上にマウントされたチャンバー200が含まれる。該プリント回路基板182には、好ましくはエッジ・コネクタ184が含まれ、エレクトロニクスを制御する該複雑度低減システム180のインターフェイシングを許容する。該エッジ・コネクタ184には、嵌合エッジ・コネクタ(図示せず)中で対応する導電性部に接触する複数の導電性フィンガー186が含まれる。従来様式のプリント回路基板182には、支持体188が含まれていてもよい。該プリント回路基板182には、導電性ストリップにパターン化され、かつ該支持体188上に配された導線190が含まれる。経路穴部(via hole)192は、所望によりプリント回路基板182中に形成してもよいが、好ましくは、該導電部194が該経路穴部192まで延在する。ポリマーゲルのごとき導電性ゲル、最も好ましくはアガロース、アクリルアミドまたは他の導電性ポリマーを、該経路穴部192内に入れる。所望により、これらの物質はイン・サイチュ(in situ)で硬化させてもよく、所望により導線194に電位を加えることによって該硬化を高めまたは促進してもよい。好ましい具体例において、チャンバー200はプリント回路基板182に結合する。シール198は、チャンバー200と支持体188との間に気密シールを形成するように作用する。チャンバー200内には、複雑度低減用の試料を含ませるために試



料容積部201が形成される。所望により、インポートポートおよび排出ポートを該チャンバー200内に含ませて、チャンバー容積部201へのアクセスを供することもできる。別法として、該試料は表面の開口部を通して該試料容積部201に適用することもできる。チャンバー200内では、1またはそれを超えるプローブ・エリア202が経路穴部192の頂部を形成する。ゲル196は好ましくはこの空間を満たし、試料容積部201つの底部で終了する。所望により、処理または投棄エリア204をチャンバー200内に含めてもよい。好ましくは、インデックス戻り止め部(index detent)206が支持体188内に配される。対合キー部208は好ましくはチャンバー200の下面に形成され、プリント回路基板182に対するチャンバー200のインデキシング(indexing)を補助する。その場合、図12に示すごとく、該キー部208が該インデックス戻り止め部と結合しつつ、チャンバー200をプリント回路基板182と嵌合させることができる。作動においては、ポリマーゲル196には捕獲プローブが含まれる。その場合、この捕獲プローブは試料中の標的物質と相互作用し、それにハイブリダイズする。DNAプローブ結合用の、ならびにDNA標的ハイブリダイゼーションおよび分離用のマトリックスを得るために、導電性ポリマーを用いて複雑度低減デバイスの経路部(via)を充填してもよい。ポリマー官能基を導入するために該デバイスの経路部を充填する前にポリマーをタンパク質結合DNA捕獲プローブと混合することができ、あるいは、共有結合捕獲プローブを導電性ポリマーと予め混合していてもよい。別法として、ポリマー性支持体へ結合するためのさらなる手段を得るために、該プローブをポリマー中に電気泳動的に輸送して、酵素的または共有的な手段によって結合させてもよい。

作動においては、流動的または電気泳動的に試料チャンバーに導入する複雑度低減デバイスの試料ウェルに該標的DNAを直接入れることができる。該試料は、50 mMホウ酸ナトリウム、pH 8または0.5×TBEを含む、幾つかの異なる緩衝液の1に導入することができる。これらの緩衝液は比較的低いイオン強度のDNAの自由フィールド電気泳動輸送を供する。試験結果を図17に示す。また、0.5×TBEおよびヒスチジンにつき向上したハイブリダイゼーションを図

16に示す。輸送の間に、電極はプラス電流に偏倚され、標的DNAはデバイスのポリマー充填経路部に電気泳動的に輸送されて、相補的標的DNAが特異的捕獲プローブにハイブリダイズすることができる。次に、電氣的洗浄工程の間に、該捕獲DNAに特異的に対合しなかったDNAは温和なマイナス電流を用いて経路部から除去される。流体洗浄によって該試料ウェルからいずれの不適当なDNAも除去され、次いで新たな緩衝液を導入する。次いで、ハイブリダイズした標的DNAは、強力なマイナス電流を用いて電気泳動的に脱ハイブリダイズさせることができる。

DNA精製を最大限高めるために、電気泳動的輸送、ハイブリダイゼーション、電氣的洗浄および脱ハイブリダイゼーションを種々の電氣的設定を用いて行うことができる。輸送および蓄積については、該設定には、経路部を満たすポリマー当たり $5-2, 500 \mu A/mm^2$ のプラスDC電流を $10-180$ 秒間(好ましくは: $200-500 \mu A/mm^2$ を $15-60$ 秒間)、 $25-75\%$ デューティレシオの $5-2, 500 \mu A/mm^2$ のパルス化電流を $15-180$ 秒間(好ましくは: $200-1,000 \mu A/mm^2$ 、 $50\%$ デューティレシオ、 $15 Hz$ を $20-180$ 秒間)、および $15-90$ 秒間に $100-500 \mu A/mm^2$ で開始して $0-150 \mu A/mm^2$ で終了させる逆線段階(reverse linear stair) (好ましくは: $90$ 秒間に $250 \mu A/mm^2$ で開始し、 $25 \mu A/mm^2$ で終了させる)が含まれる。電氣的洗浄は、 $15-180$ 秒間の $200-300 \mu A/mm^2$ のマイナスDC偏倚または $200-500 \mu A/mm^2$ のパルス化電流で行う。脱ハイブリダイゼーションは、 $60-420$ 秒間の $400-750 \mu A/mm^2$ のマイナスDC電流で行う。

蛍光定量検出の目的には、標的DNAを発蛍光団で標識して、“リバーシ・ドットプロット”ハイブリダイゼーションに付することができる(図16および19)。加えて、標的DNA“サンドイッチ2ハイブリダイゼーションの非ハイブリダイズ領域に対して相補的なDNAの発蛍光団標識鎖の導入によって捕獲プローブにハイブリダイゼーションさせた後に、該標的DNAを検出することもできる。別法として、該発蛍光団標識はPCRによって増幅させた標的DNAに導入する

こともできる。

図13は、本発明の垂直に配したDNAまたは核酸精製デバイスの切欠斜視図を示す。上部貯蔵チューブ210はチューブ214を介して下部貯蔵部212と連通しており、上部貯蔵部210から下部貯蔵部212へ流体連通を許容する。該貯蔵部210、212は緩衝液216を受けるように適合される。所望により、該上部貯蔵部210および下部貯蔵部212は、上部貯蔵部210の底部218が下部貯蔵部212の頂部220に封止接触させることによって閉鎖系を形成するように、形成することもできる。別法として、該系は開放系とすることもできる。該上部貯蔵部210には第一電極222が含まれ、該下部貯蔵部には第二電極224が含まれる。該第一電極222および該第二電極224は、各々、カソードおよびアノードとすることができるが、これらの用語は所定の作動の極性により相互変換し得る。該チューブ214は、好ましくは貯蔵部210、212の内径よりも小さい内径を有する。該チューブ214には導電性ポリマー領域226が含まれる。該導電性ポリマー領域226は、異なる移動性領域を含むモレキュラーシープである。荷電生物高分子に異なる移動性を与える物質には、アガロースおよびポリアクリルアミドのごとき物質が含まれる。

好ましい具体例において、該異なる移動性物質は、チューブ214中の支持膜228上に形成した、50mMヒスチジン中にキャストさせた1.5%アガロースゲルである。所望により、該導電性ポリマー領域226は、膜228に隣接して配することもできる。好ましくは、該膜228は多孔性、例えば5 $\mu$ mポアサイズであって、導電性ポリマー226を形成するための支持体を供するように部分的に作用する。チャンバー230は、導電性ポリマー226に隣接して配される。好ましくは、該チャンバー230は、導電性ポリマー領域226の容積よりも小さな容積、例えば、導電性ポリマー領域226よりも好ましくは容積においてほぼ50%以下、最も特には容積においてほぼ1/3以下である容積を有する。該チャンバー230が導電性ポリマー領域226と比較して小さな容積を有する場合には、小さな内径領域232を該チューブ214に形成することができる。この小さな内径領域232は、押縁部234を有利に形成し、その上に膜22

を配し得る環形領域が供される。所望により、第二膜236がチャンバー230の境界部を規定してもよい。該第二膜236は、好ましくは、限外濾過膜のごとき分子量カットオフ膜を構成し、これは、DNAはチャンバー230内に保持するが、プロテインキナーゼKに付したタンパク質のごときより小さな物質は通過させるように作用する。かかる限外濾過膜には、酢酸セルロースまたはセルロースから形成されるものが含まれる。

作動においては、試料の細胞に対して作用するガラスビーズの運動によるごとく、試料を予め溶解する。加えて、好ましくは250 $\mu$ mの直径の開口部のごとき、比較的狭い開口部を通す運動によるごときせん断にも該試料を付す。好ましくは、目的物質、例えばDNAと比較してタンパク質または他の非目的物質の異なる移動性が増大するように、該タンパク質または他の非目的物質のサイズを減少させる処理工程に該試料を付す。例えば、プロテインキナーゼKの添加により、20,000ダルトン以下のごとき、タンパク質のサイズを減少することができる。プロテインキナーゼKのこの適用は、反応速度を増大させる高い温度、例えば37-50 $^{\circ}$ Cにおいても行い得るが、室温においても行い得る。好ましい具体例において、該ライゼート細胞は、50 $\mu$ Lの合計容量の250 $\mu$ g/mLプロテインキナーゼK、0.5 $\times$ TBE 50mM EDTA緩衝液(37-50 $^{\circ}$ C)で消化する。次に、例えば好ましくは5%-20%、最も好ましくは実質的に8-10%のスクロースのごとき濃縮(densification)剤を作用させて、試料の密度を高める。所望により、該濃縮物質はプロモフェノールブルーのごとき色素と合してもよい。次いで、濃縮し、予め調製した試料を、シリンジを用いるごときによって、導電性領域226の上方に注射または入れる。濃縮試料の使用は、導電性ポリマー領域226のすぐ上方に当該試料を位置させ、かつ濃縮するように作用する。次いで、系を作動させて荷電物質の電気泳動的運動を引起す。該系は、DNAが導電性ポリマー領域226に移動し、小さなサイズのタンパク質が該導電性ポリマー領域226を実質的に横切ってチャンバー230および下部貯蔵部212に入ることができる時間、作動させる。好ましい具体例において、該試料は1,000mA制限で、2.25mAの電流にて6-8分間ゲルに流す。カソードは、プロテ

インキナーゼKおよび他のプラスに荷電した物質を誘引および破壊するようにもさらに作用する。所望により、新たな緩衝液216を下部貯蔵部212に供し、第二膜236を(当該デバイス内に最初に含めることもできるが)この時点で加えてもよい。好ましい具体例において、該膜236は25kD分子量カットオフ膜である。次に、DNAを導電性ポリマー領域226からチャンバー230へと溶離する。好ましい具体例において、該試料は、1,000V制限で、ほぼ2分間にゲルから溶離チャンバー230へと溶出する。次いで、穿孔するかまたはポートおよびバルブ配置を配するごときによって、該DNAをチャンバー230から抽出する。

図13の系は垂直配置で示すが、それは水平配置で行うこともできる。該垂直配置により、試料溶液236と導電性ポリマー226との間に一定の接触空間が与えられる。さらに、濃縮剤の使用により、導電性ポリマー領域226にすぐ隣接して試料溶液236を局在させ、該試料溶液236が導電性ポリマー領域226に到達するのに必要な時間を短縮することができる。図17に示すごとき水平配置においては、ポリマー(もしくはゲルまたは膜)のせき板を用いて、電極緩衝液からの試料の分離を維持して、それらが混合することを防ぐことができる。

図14は、試料調製領域、複雑度低減領域、診断領域および処理領域を含む一体化デバイスの平面図を示す。図14Aは、線A-A'に沿った図14の断面図を示す。プリント回路基板のごとき支持膜240は、好ましくは以下に記載する種々のコンポーネントを支持するように作用する。所望により、図10-12に関連して前に論じたごとく、エッジ・コネクタ242が、制御エレクトロニクスに対する電氣的接続を供することもできる。試料調製領域244には好ましくは第一緩衝液含有領域246が含まれていてもよく、これも電極と電氣的に連通して存在する。ゲルまたは他の導電性物質のごとき物質248は、緩衝液領域246とインプットポート250との間に配される。好ましい具体例において、該インプットポート250にはカバーが含まれ、それは所望により試料投入のために除去してもよく、あるいは試料を試料ポート250内に入れたら密閉して、突き刺すことができる。DNAトラップ252は、インプットポート250とタン

パク質トラップ260との間に配される。好ましくは、該DNAトラップは当該DNAトラップ252を通して物質が電気泳動されるにつれて幅が狭くなるか、または収縮する。1つの具体例において、傾斜上部254および中心側に向けて傾斜する側壁部256は、ゲル境界部258で収縮を形成するように作用する。かかる構造により、濃縮効果が供される。好ましくは、該タンパク質トラップ260および緩衝液空間264はy-型様式で形成される。その場合、タンパク質トラップ260は、電極を含む緩衝液空間262に接触している。

試料調製構造244は、一般的には以下のように作動させる。まず、試料をインポートポート250に入れる。電極の電気泳動作用によって、緩衝液領域246を連結する向きから緩衝液領域262に向けて荷電高分子の導電が引き起こされる。好ましい具体例において、細胞を溶解しタンパク質を消化して、DNAトラップ252を通してDNAよりも比較的高い移動度を有するタンパク質様物質とする調製工程に該試料を付す。したがって、電気泳動を続けるにしたがい、DNAが到達する前に、タンパク質物質がタンパク質トラップ260に到達する。タンパク質がタンパク質トラップ260に到達した後に、電極および緩衝液領域262は中性に変化し、かつ電極および緩衝液領域264は中性からプラスに印加される。その場合、DNAトラップ250を通して移動しているDNAは、緩衝液空間264に加えられたプラスの電位により誘引される。この様に、タンパク質はタンパク質トラップ260に分路し、一方、DNAはおそらくはより遅い時間に、チャンバーポート266に分路する。DNA濃縮容積を、緩衝液空間264内のゲル境界部258を超えるその部分として図14Aに示す。

本発明の1つの態様において、緩衝液空間264には、当該緩衝液空間264への結合チューブ270によって連結されている図14および14Aに示すごとき、当該緩衝液空間264の一末端につなげられたチャンバーポート266と当該緩衝液空間264の反対側の末端に流体的につなげられた第二ポートまたは流入ポート268とが、投入部として含まれる。作動においては、流入ポート268およびチャンバーポート266は、緩衝液、試薬または空気スラッグのごとき同一または異なる液体または気体を受けることができる。流入ポート268およ

びチャンバーポート266に供される物質の作用によって、水圧または気圧ラムが生じ得る。例えば、緩衝液空間264が、DNAトラップ252から緩衝液空間264に溶離されたDNAを含む場合には、流体、例えば緩衝液を流入ポート268に押し込んでDNAをコネクタ272に移動させることによって、その物質をコネクタ272に押し込むことができる。有利には、空気スラッグを用いて、種々の流動性物質を分離することができる。加えて、流体を流入ポート266、268から引出して、通常のプロセッシング流動向きとは一般的に反対の向きに他の物質を運動させることもできる。

図14および14Aに示す構造には、複雑度低減領域274と連通されているコネクタ272がさらに含まれる。外部収納容器276は、複雑度低減領域274の外縁を規定する。図10-12に関連して前記した構造および機能を有する1またはそれを超えるプローブ空間278を使用することができる。同様に、1またはそれを超えるせき板空間280を、図10-12に関連して記載したごとく複雑度低減領域274内に配することができる。好ましくは、容積減少領域282は、複雑度低減領域274を診断領域284に連結する。小さな容積領域282は、濃縮機能を供する。診断部284の構造および機能にはいずれの公知の診断も含まれ得るが、好ましくは(出典明示して本明細書の一部とみなす)1993年11月1日に出願された米国特許出願番号08/146,504号“Active Programmable Electronic Devices for Molecular Biological Analysis and Diagnostics”中に記載されているごとき、電氣的に向上したハイブリダイゼーション/脱ハイブリダイゼーション・デバイス(electronically enhanced hybridization/dehybridization device)が含まれる。好ましくは、コネクタ288は廃棄領域286への流体連通を供する。該廃棄領域286は、好ましくは生物学的コンタミネーションが避けられるように十分な含有容積である。

本明細書中の方法およびデバイスは一般的に一連の系、例えば試料調製セクション、複雑度低減セクションおよびアッセイセクション、として記載したが、該ステージの幾つかまたはすべてを平行形式または多重形式で行うこともできる。1つの具体例において、各々、試料調製領域、複雑度低減領域およびアッセイを

含む2またはそれを超える平行セットを用いることができる。別の具体例としては、2またはそれを超えるセットの試料調製セクションは、出力をより少数、例えば1つの複雑度低減領域とし得、好ましくはつづけてアッセイを供する。別法として、2またはそれを超えるセットの試料調製セクションおよび複雑度低減領域は、それらの出力をより少数、例えば1つのアッセイとし得る。本発明による他の変形および組合せは当業者に明らかであろう。

さらに、本発明はしばしばDNAについて言及しているが、本発明の目標および機能に合致する場合には、該技術をRNAまたは他の荷電高分子にも適応し得ることは理解される。本発明の方法および装置を溶解の時点でRNAに用いる場合には、使用者はリボヌクレアーゼ・インヒビターおよび無リボヌクレアーゼ・デオキシリボヌクレアーゼを添加して、DNAを除去することが好ましいであろう。残りの精製プロセスは前記に準じる。大部分のmRNAに含まれるポリA RNAの単離、およびリボソームRNAの除去は、複雑度低減・チャンバーで好ましくは行う。所望により、オリゴdTプローブを用いて、電気的ハイブリダイゼーションの間にポリA RNAを結合することもでき、非ハイブリダイズRNA、大部分のリボソームRNAは除去されるであろう。該ポリA RNAを放出させるためには、好ましくは電気的脱ハイブリダイゼーションを用いることができる。同様にして、該複雑度低減デバイス中のmRNAの特異的配列に相補的なプローブを用いることによって、それを単離することができる。電気的ハイブリダイゼーションはDNA標的に対して行われ、非ハイブリダイズの不適当なRNAは除去される。目的のmRNA種は、電気的脱ハイブリダイゼーションによって該プローブから溶離される。

電位、電流および／または電源をこれらの発明のいずれかの電極に供給するための電源および制御系は、当業者に知られているものの中で選択し得る。電圧および／または電流は、所望により、制限値または最大値に付してもよい、固定電流または固定電圧のいずれかで供給することができるが、フロート(float)させ得る他の変動であってもよい。該制御系はアナログでもデジタルでもよく、所望によりマイクロプロセッサ制御を含む分離または一体化コンポーネント、あるいは



はそれらいずれかの組合せより形成されていてもよい。該系のソフトウェア制御を有利に用いる。

#### 実験データー実施例1－Qiagenに対する図13のデバイスの比較

図13に示すデバイスの相対的性能を、先行技術Quiagen systemと比較した。比較について、図13のデバイスの調製物および作動は以下の通りであった。

まず、定常期浮遊培養のスタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) の細胞をペレット化し、次いで1000  $\mu$ Lの0.5×TBE、50 mM EDTA中に再懸濁し、次いでガラスビーズ存在下のボルテックス攪拌によって溶解した。次いで、RNAおよびタンパク質を50  $\mu$ g/mLのリボヌクレアーゼおよび250  $\mu$ g/mLのプロテインキナーゼKで50℃にて40分間消化することによって断片化した。次に、おおよそ $10^9$ 細胞に相当する20  $\mu$ Lの試料に40%のスクロース5  $\mu$ Lを添加して最終濃度8%を達成することによって、試料密度を上昇させた。該試料を負荷する前に、当該デバイスに50 mMヒスチジンを満たし、次いで25  $\mu$ Lの試料を試料溶液ゾーン236に負荷した。別の実験においては、100  $\mu$ Lほど大きな容積を用いたが、同様の結果が得られた。次に、電極を電源に接続し、電流を2.5 mAで供給した(source)。別の実験においては、1 mAほど小さな電流を用いたが、輸送が鈍化した以外は同様の結果が得られた。3分後に、電力を切り、円筒部を外して25 kD分子量カットオフを有する酢酸セルロース膜を第二膜236として挿入した。溶液も除去して、新たな50 mMヒスチジンをデバイスに添加した。再アセンブリした後に、電力を入れ、ゲルを支持する酢酸セルロース膜228および25 kDカットオフ酢酸セルロース膜236によって形成されるチャンバー230に試料を溶離させた。溶離試料を取出するために、電力を切り、円筒部を取り外し、ピペット／シリンジを用いて25 kDカットオフ膜を突き刺して、試料溶液を引き出した。すべての電気泳動工程の合計時間は5分未満であった。試料はアガロースゲル電気泳動および分光測定によって分析した。ゲル電気泳動により、該DNAはほぼ20 kb長であって、収率はほぼ20%であることが示された。

比較のため、同一の溶解および消化方法によって調製した粗製試料をQiagenデ

バイスで処理した。該Qiagenデバイスはその指示書に従って作動させた。Qiagenデバイスで得られた結果に対する比較は以下の通りである。

光学密度の判読を行い、260ナノメートル～280ナノメートルにおける該光学濃度の比を判定した。図13のデバイスでは種々の作動に対して1.6～1.8の比が得られ、それに対して、Qiagenデバイスでは同一試料で1.3未満の結果が得られた(Qiagen社刊行物には、実際に1.7～1.9の比を得ることができ旨述べられている)。しかたがって、この試料に対して行った実際の試験においては、図13のデバイスにより精製DNAが得られた。二番目に、1993年11月1日出願された出願番号08/146,504号、“Active Programmable Electronic Devices for Molecular Biological Analysis and Diagnostics”中に開示されているごとく構築したマイクロエレクトロニック・チップ上の調製試料の輸送は、Qiagen調製物質の同デバイス上の輸送よりも良好であった。このことは、Qiagen物質が比較的高い残存塩含量を有し、それ故、該チップ上の輸送が図13の方法および構造によって調製した物質の輸送の場合よりも不十分であったと考えられる。図15は、Qiagenデバイスによって調製した試料と比較した本発明のデバイスによって調製した試料の輸送の試験結果を示している。三番目に、試料調製は、図13のデバイスではほぼ5分（一の試験においては6.5分）と、Qiagenデバイスについては2時間を超えたのと比較して顕著に早かった。最後に、両方法についての収率は同様で、ほぼ20%であった。

#### 実施例2—図1のデバイスの性能

その実際の形状を本明細書に開示したが、デバイスは図1と同一の構造コンポーネントを用いて調製した。該精製デバイスは、図1に一般的に示すごとくポリメタクリレート(PMA)から構築した。異なる物質22、16および24を挿入し得るようにするために、該デバイスは、その末端がスペーサー領域16によって示されるラインで合わさるPMAの分離セクションからアセンブリする。該セクションは長手方向に入れるネジによって互いに保持される。Ptワイヤから

製作した電極を電極26、28に接続した。該ワイヤは電極チャンバー18、20に突出している。電極チャンバー18、20に、300 $\mu$ L TAE、250

mM HEPESを各々満たした。Schleicher and Schuell社製のElutrap限外濾過酢酸セルロース膜を、膜24のポジションのPMAセクションの間に挿入し、Sialomed社製の25 kDカットオフ酢酸セルロース膜を膜ポジション22に挿入して、試料チャンバー12、14から電極チャンバー18、20を分離した。該試料チャンバー12、14には、TEA、250 mM HEPESを各々75  $\mu$  L満たした。異なる膜をスペーサー領域16に挿入してタンパク質からのDNAの分離を達成したが、この実験においては、スペーサー領域16にはMillipore社製のImmobilon P膜(0.45  $\mu$  mポアを有するPVDF)を含めた。該膜は、領域16に負荷する前に、メタノールで湿らし、次いで1×TAE、250 mM、0.1% Triton×100中に浸漬した。粗製試料、1×TAE、250 mM HEPES中のタンパク質の混合物162  $\mu$  L、48.5  $\mu$  gのBodipy Fluorescein標識-BSA、および0.79  $\mu$  gのBodipy Texas Red標識-19merをチャンバー12に負荷した。該試料を添加した後に、10 mAにて2.75分間、第一電極26をマイナスに偏倚させ、第二電極28をプラスに偏倚させた。その結果、試料はスペーサー領域16に電気泳動的に輸送された。標識DNAは膜を通過し、右中央チャンバー14中の該膜のもう1つの側で収集された。DNAおよびBSAの量は蛍光定量法によって判定した。その結果は、DNAの収率は40%であって、BSAの78%が除去されたことを示している。

### 実施例3—複雑度低減デバイスの性能

グループAレンサ球菌(GAS)実験、図18および19においては、導電性ポリマーを20  $\mu$  M濃度の25merストレプトアビジン-ビオチン結合捕獲プローブと予め混合する。GAS実験、図18および19においては、40  $\mu$  Lアリコットの標的DNAを50 mMヒスチジン中の試料ウェルに入れる。電気泳動的輸送は250  $\mu$  A/mm<sup>2</sup>で始め、25  $\mu$  A/mm<sup>2</sup>で終了する線段階(linear stair)を用いて行い、電氣的洗浄は250  $\mu$  A/mm<sup>2</sup>パルスを用いて、各々4

5秒および120秒間行った。脱ハイブリダイゼーション、図18は0.5×TBE中、400  $\mu$  A/mm<sup>2</sup>にて150秒間行った。図18からの結果は、純粋

ハイブリダイズ標的のほぼ33倍（100：3）の精製比および82%の回収を示している。図19は、200,000倍過剰量の不適当な物質の存在下における、3・4倍の精製比を有する不適当なDNAの比が上昇してゆく場合における特異的標的の精製を示している。

前記の発明を、明瞭および理解目的で図示および実施例の方法によって幾分詳細に説明したが、本発明の教示に鑑みて、添付する請求の範囲の趣旨および範囲から逸脱することなくある種の変化および修飾を施し得ることは、当業者であれば容易に分かるであろう。

【図1】

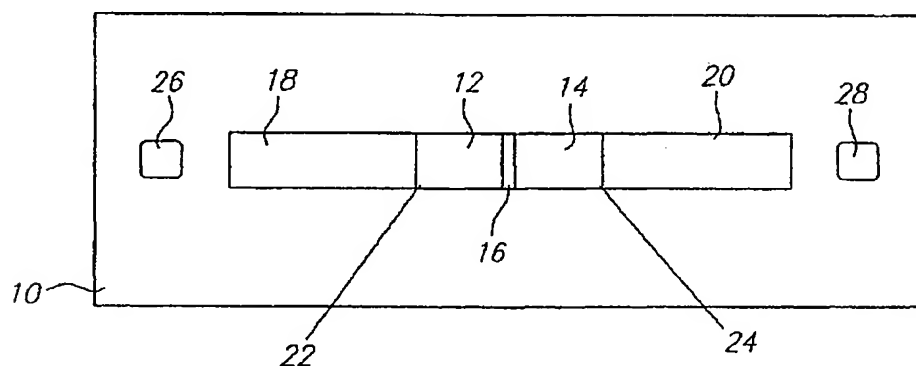


FIG. 1

【図2】

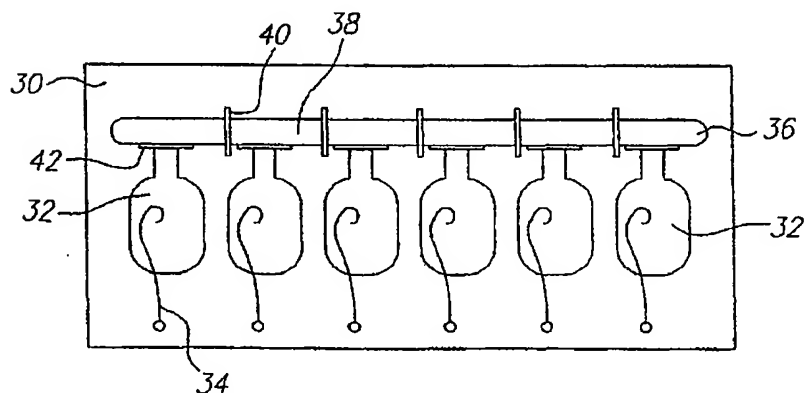


FIG. 2

【図3】

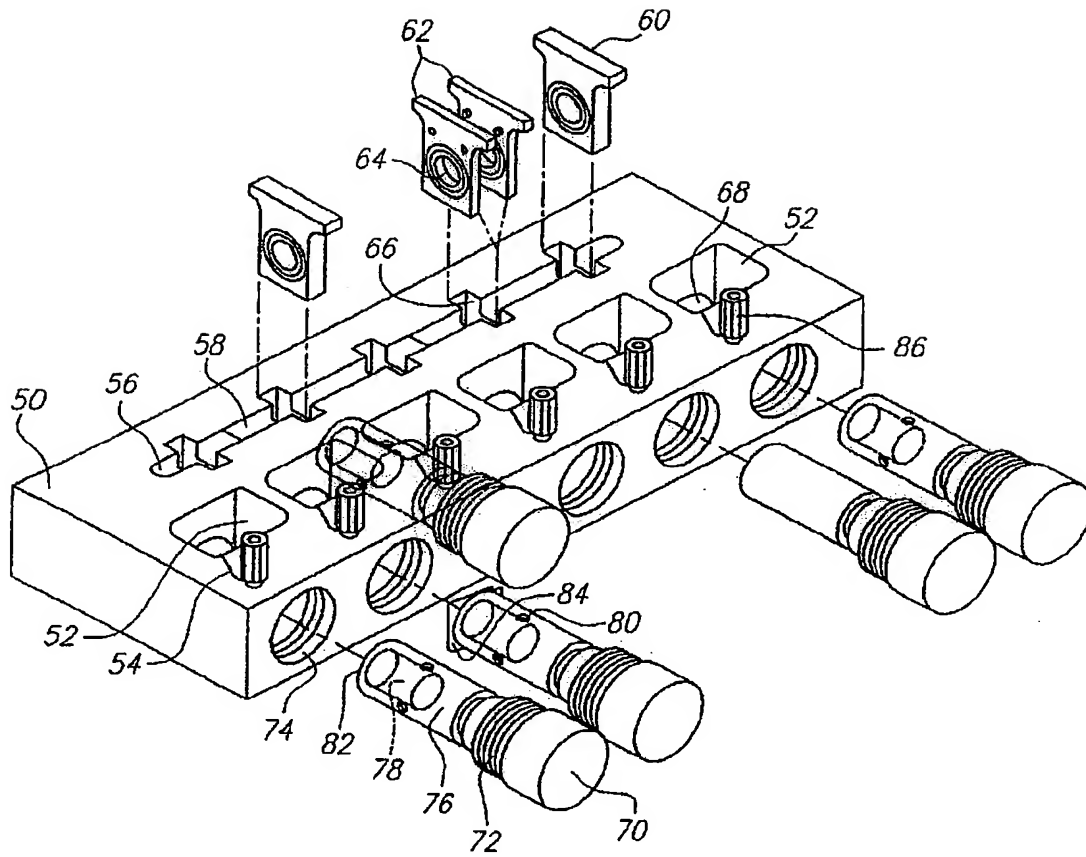


FIG. 3

【図4】

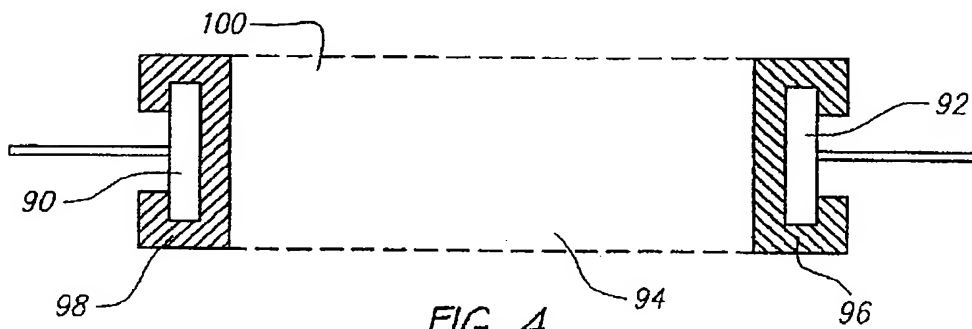


FIG. 4

【図5】

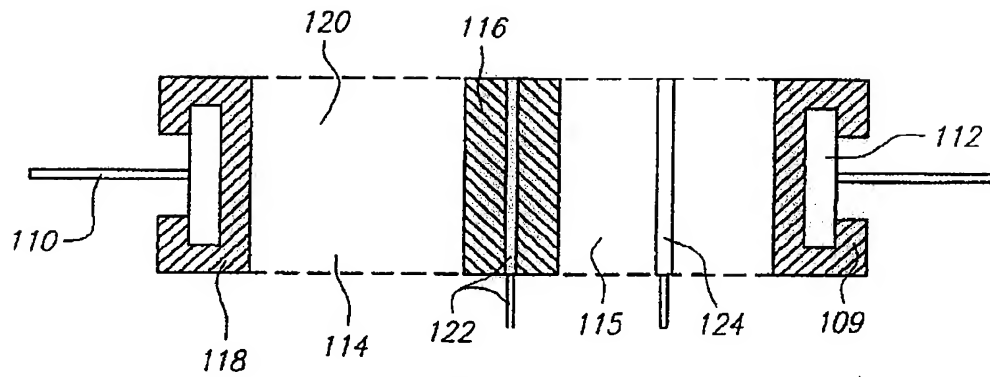


FIG. 5

【図6】

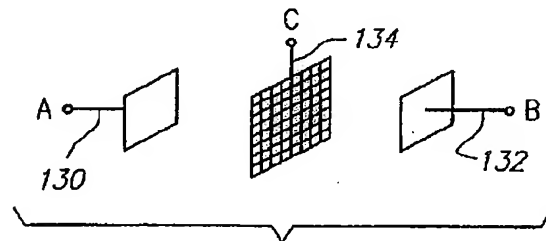


FIG. 6

【図7】

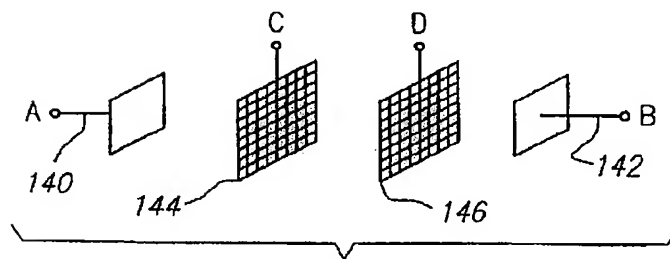


FIG. 7

【図8】

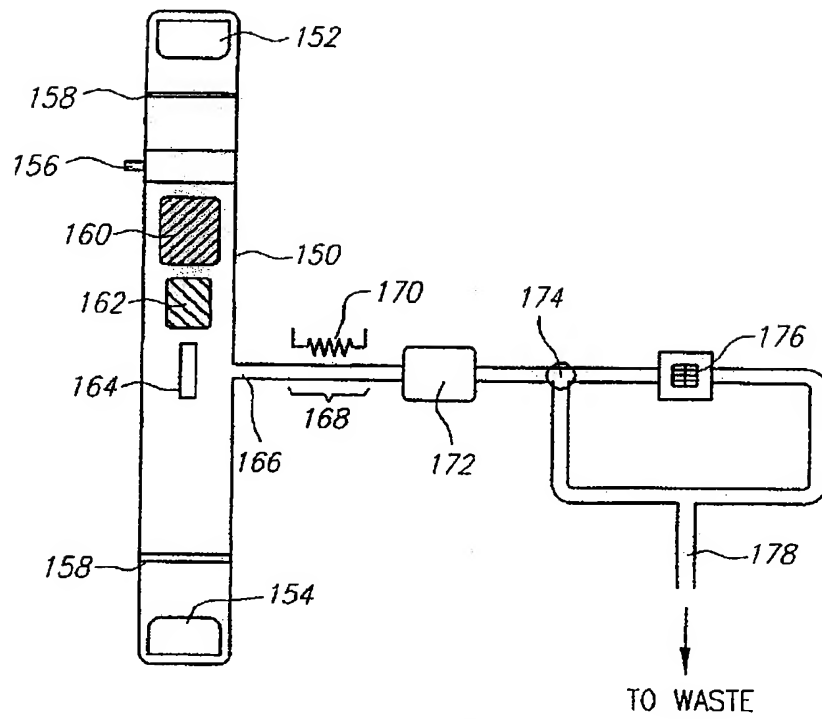


FIG. 8

【図9】

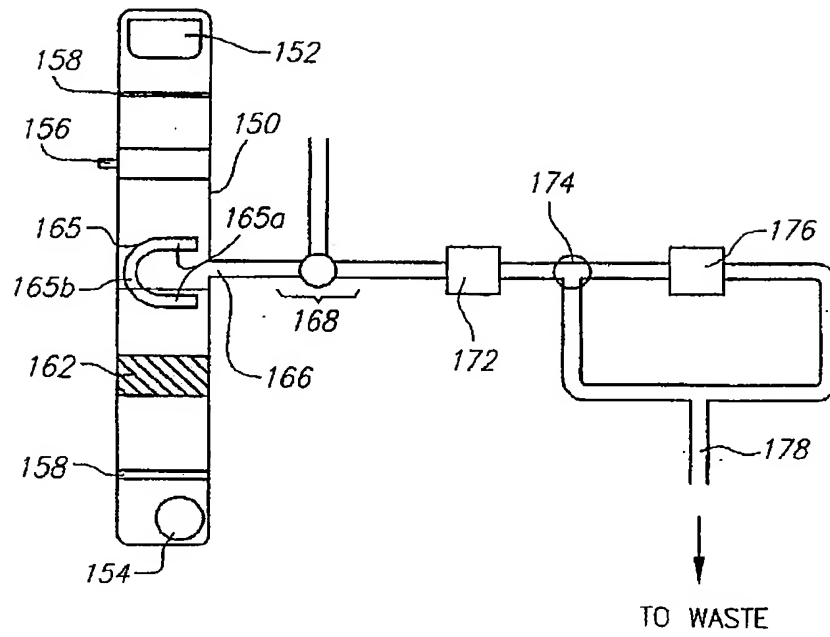


FIG. 9



【図10】

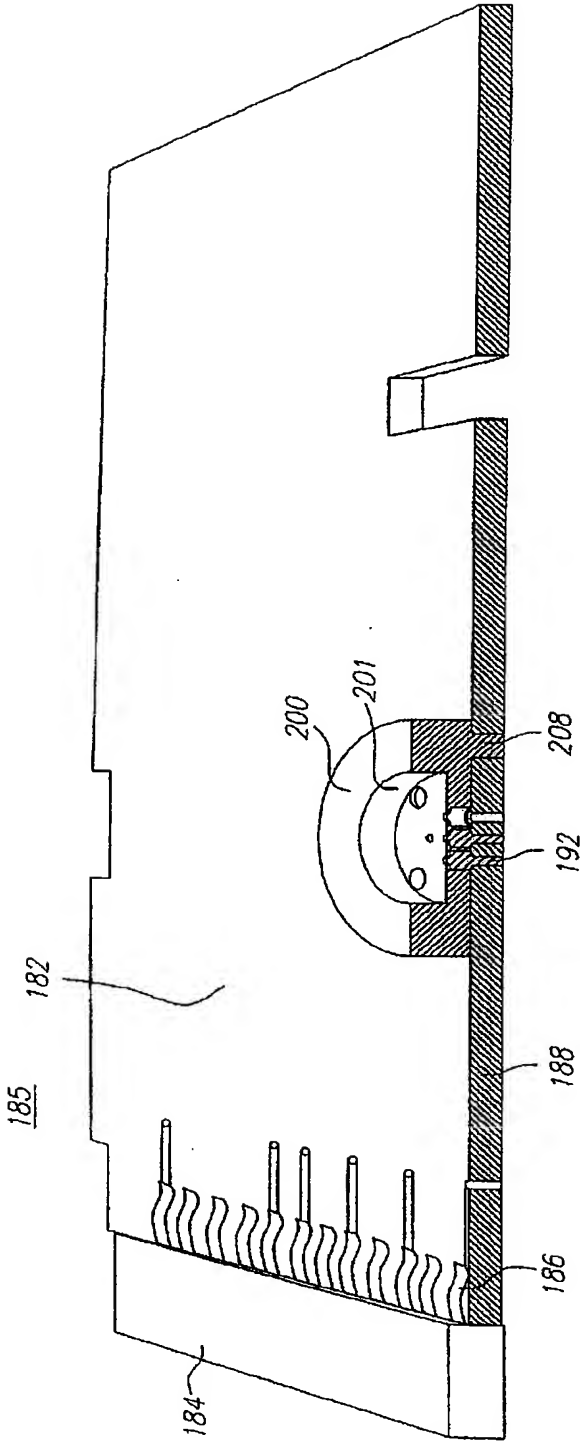


FIG. 10

【図11】

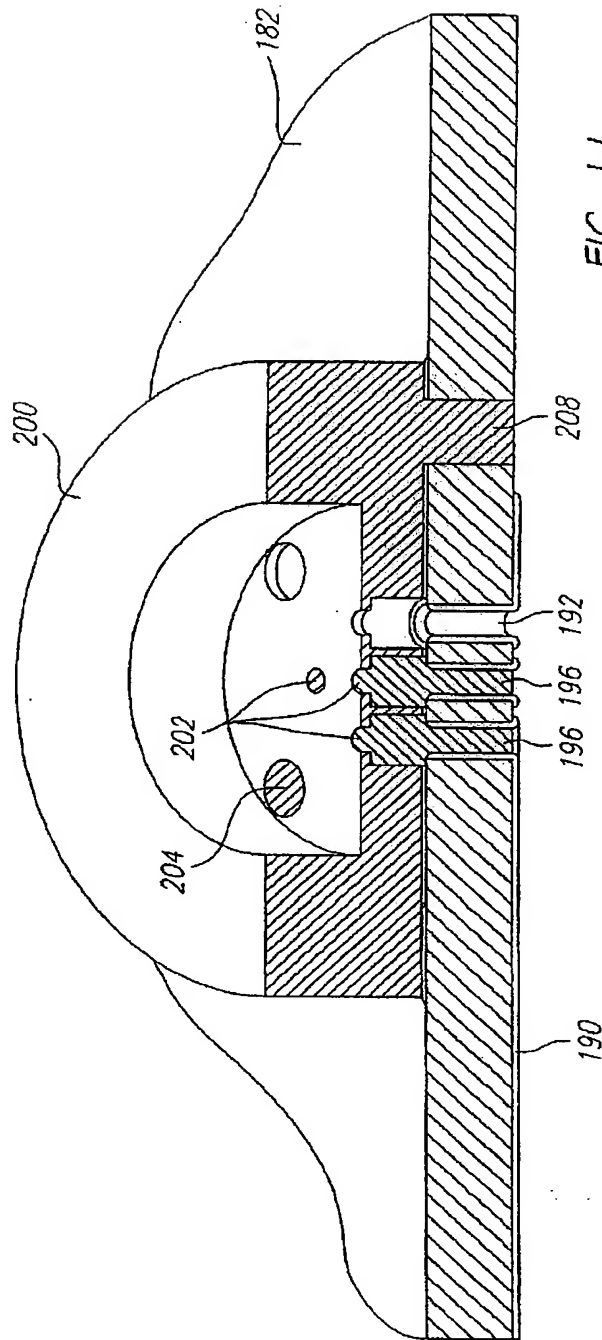
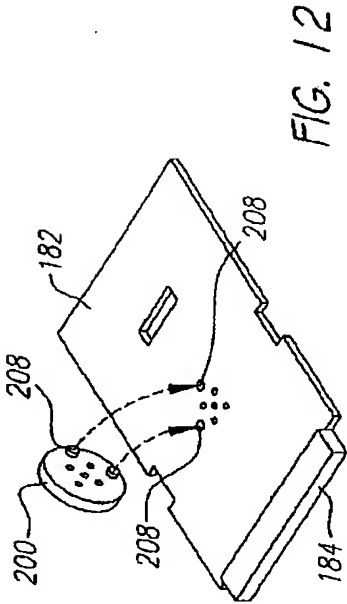


FIG. 11

【図 1 2】



【図13】

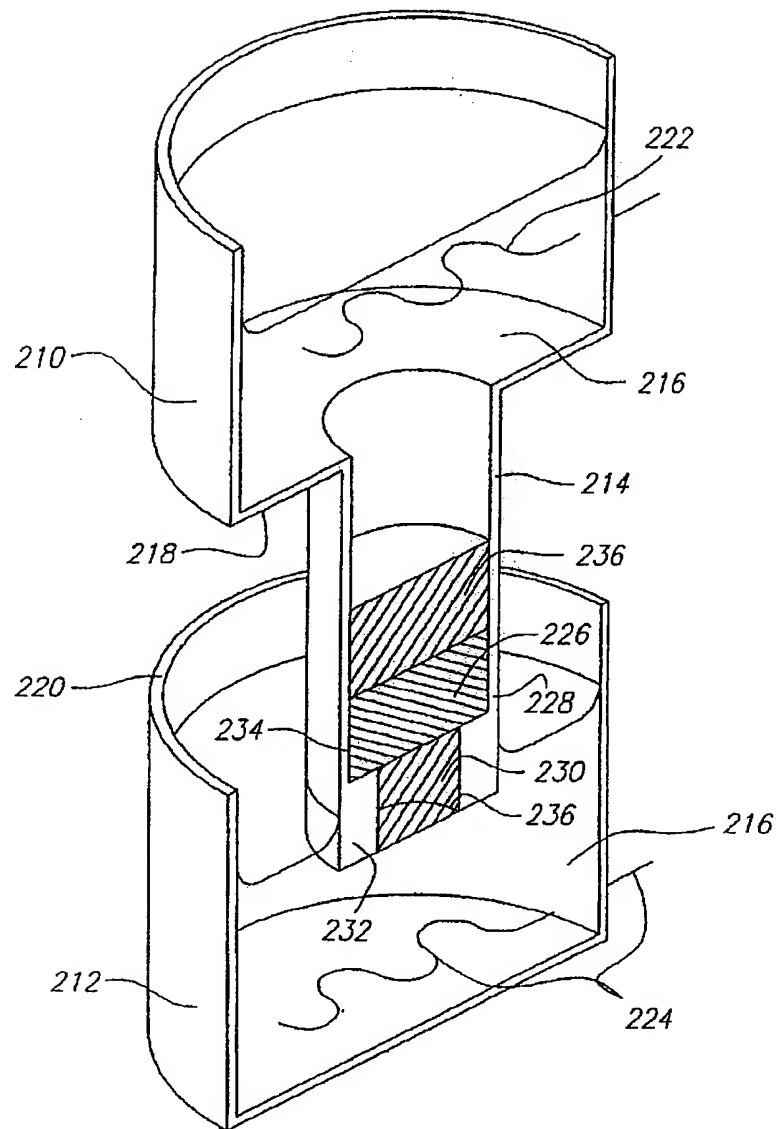


FIG. 13

【図14】

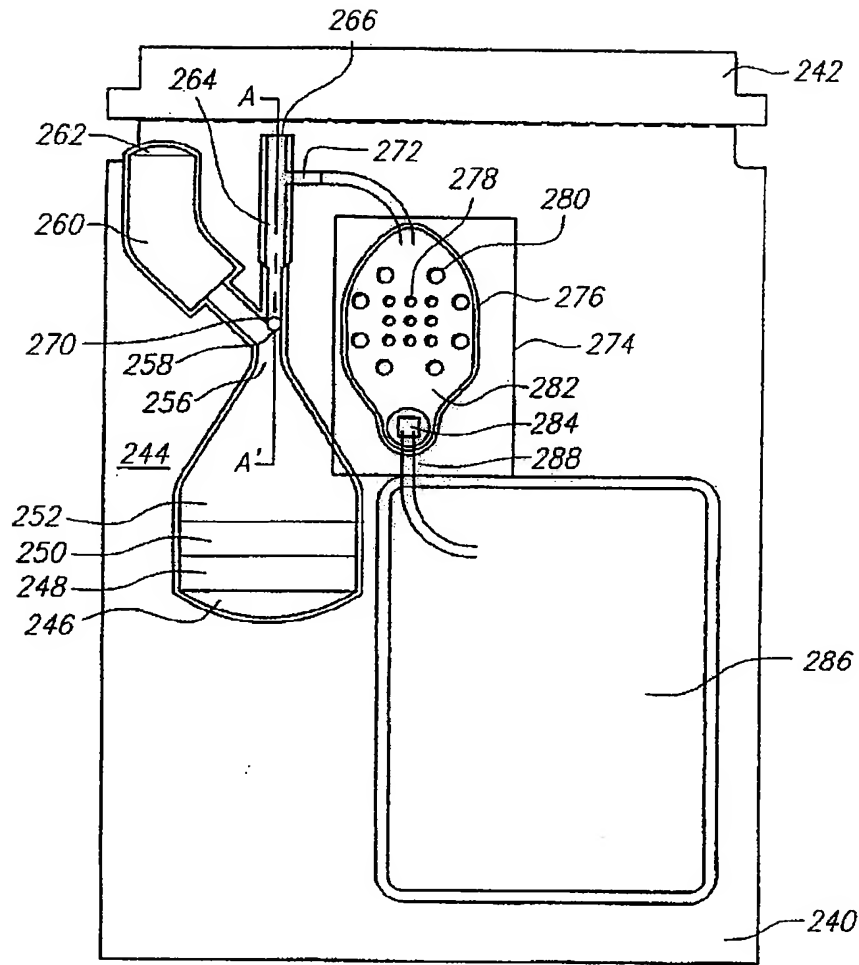


FIG. 14

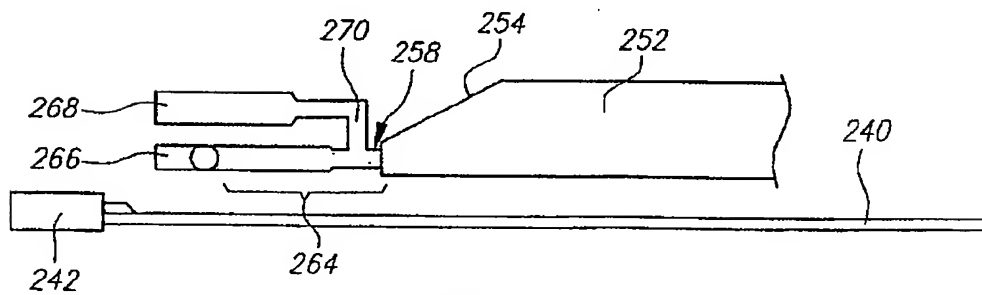


FIG. 14A

【図15】

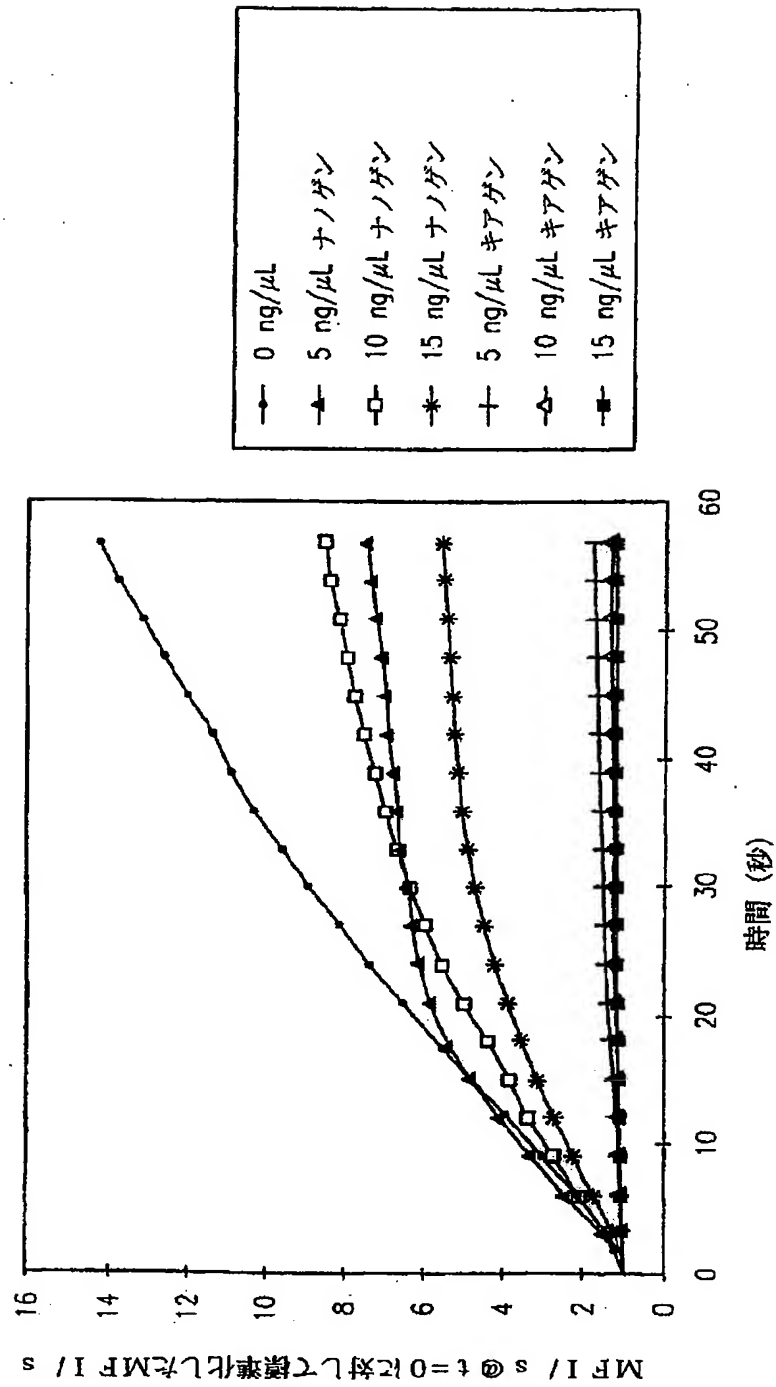
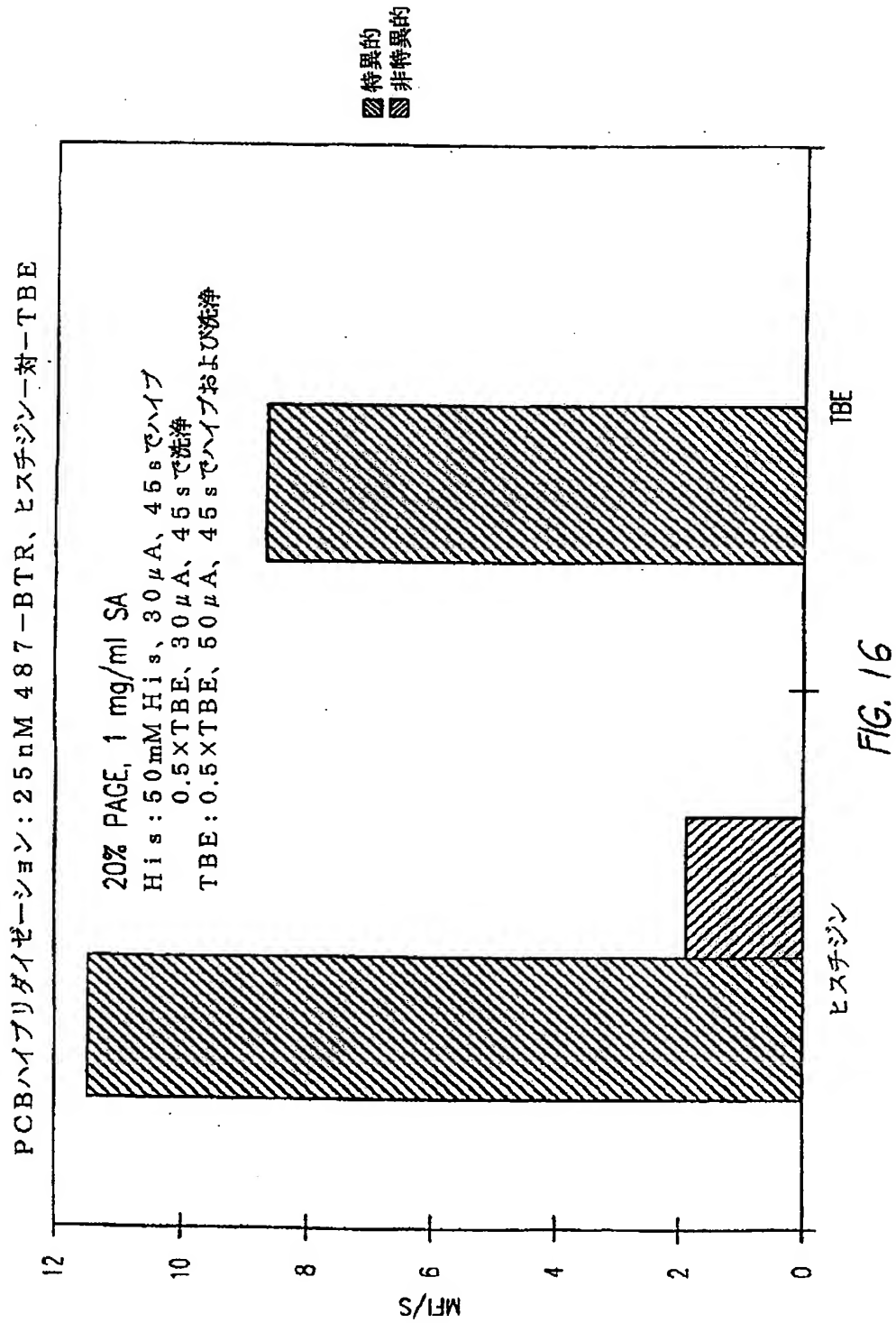


FIG. 15

【図16】



【図17】

シグナル蓄積：バックグラウンドで補正したチップー対ーPCB装置、

ヒスチジノー対ーTBE、

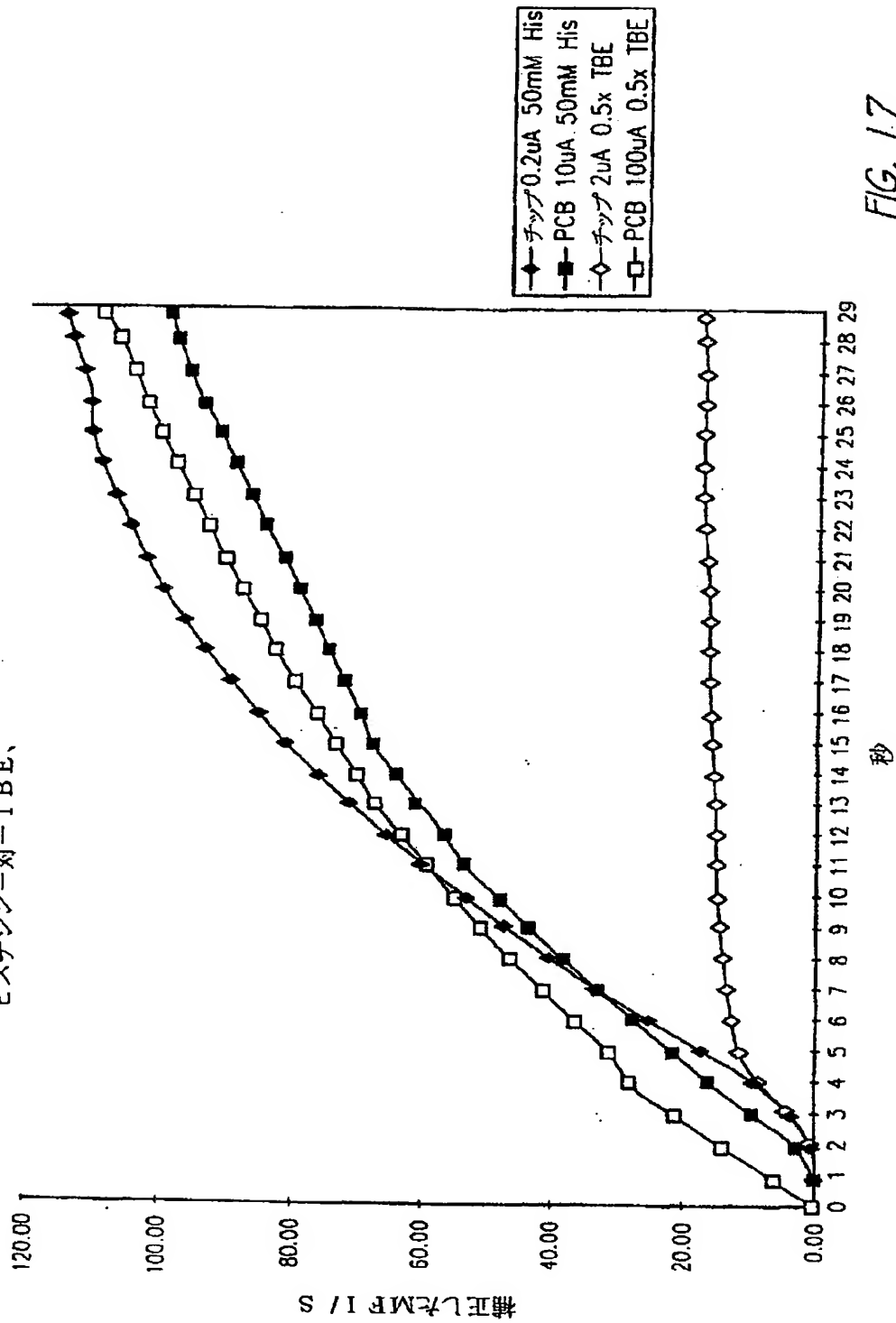


FIG. 17



【図18】

GASのハイブリダイゼーションおよび脱ハイブリダイゼーション後のシグナルレベル

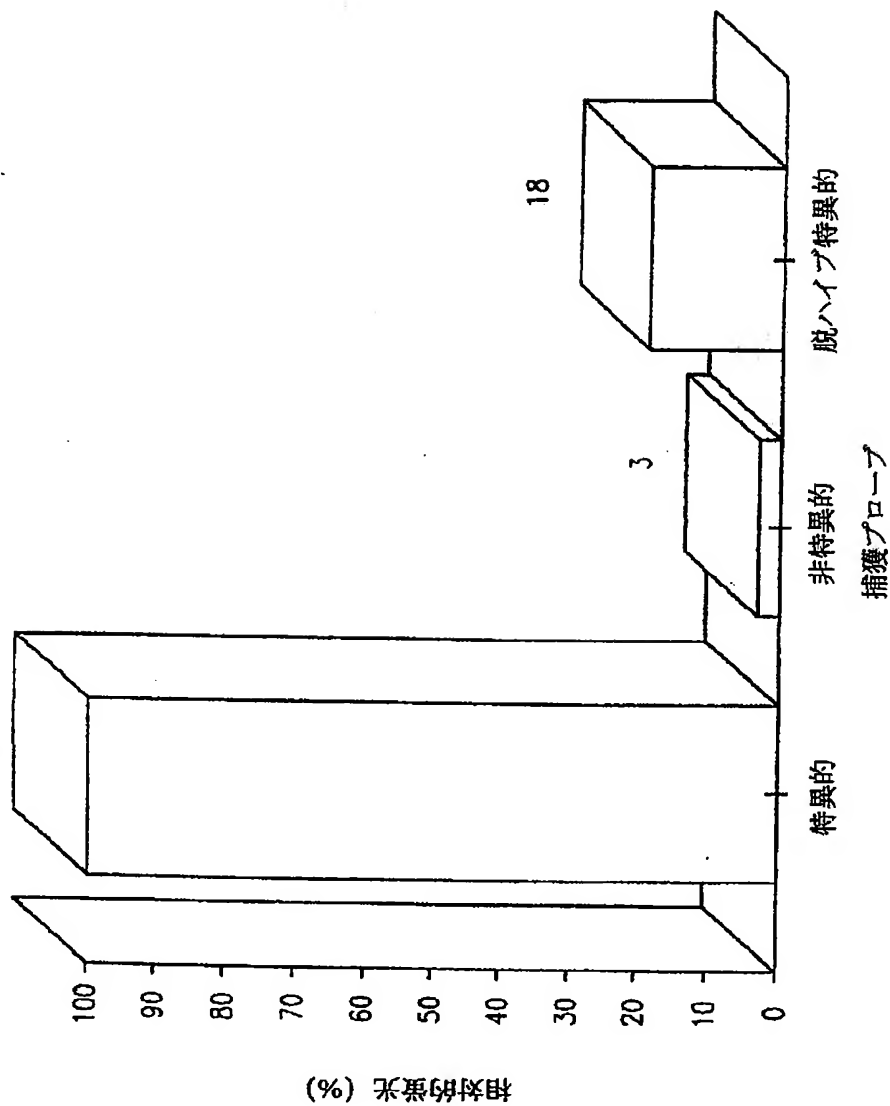


FIG. 18

【図19】

2  $\mu$ g huDNA/40  $\mu$ l 存在におけるDS GASの

ハイブリダイゼーション特性

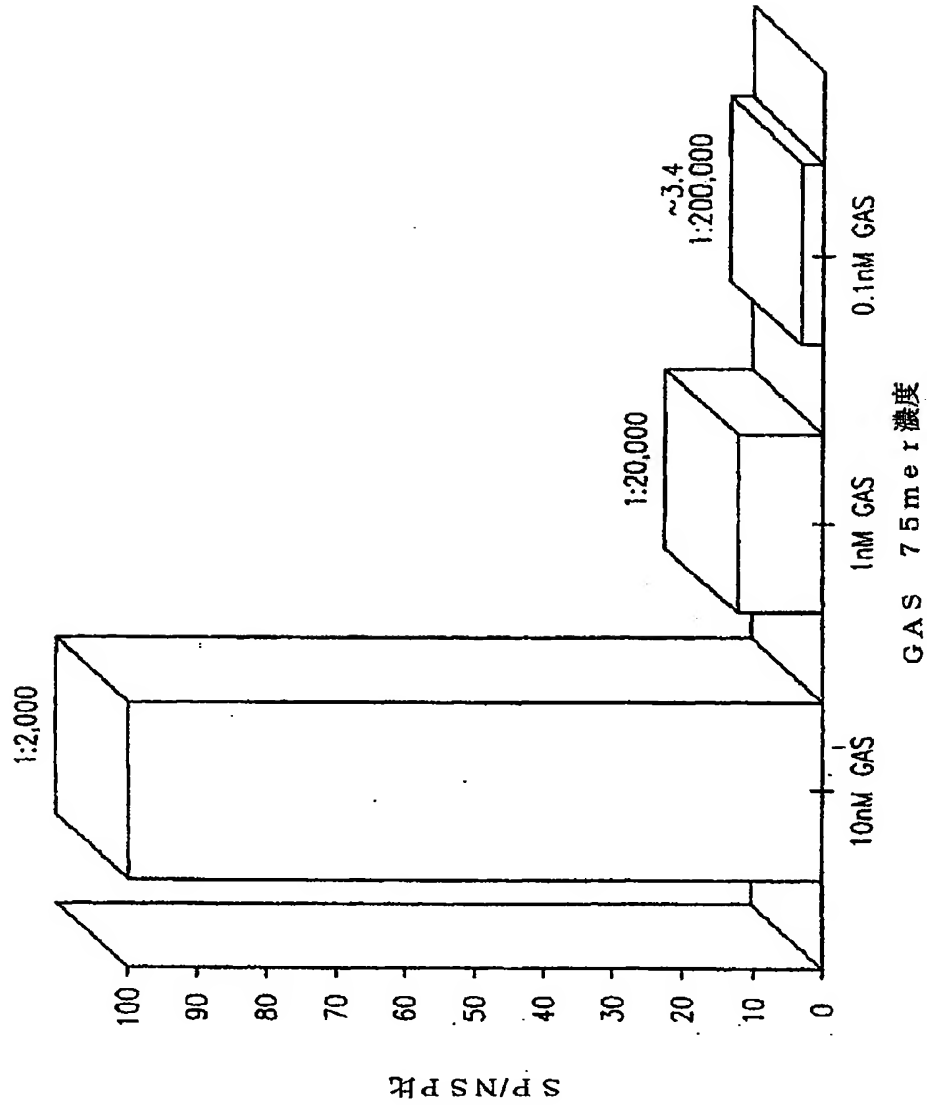


FIG. 19

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.

PCT/US 97/13525

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 G01N27/447		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 93 05390 A (GUZMAN, N.) 18 March 1993 see page 31, line 28 - page 32, line 29; figure 31	1,29
Y	EP 0 471 949 A (HEWLETT-PACKARD CO.) 26 February 1992 see column 3, line 57 - column 5, line 40; figures 1,2	1,29
A	US 5 126 022 A (D. S. SOANE) 30 June 1992 cited in the application see abstract; figure 1	53
A	US 3 533 933 A (L. STRAUCH) 13 October 1970 see abstract; figure 1	56,69,85
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  30 October 1997		Date of mailing of the international search report  14. 11. 97
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 2911 Patentplan 2 NL-2280 HH Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2240, Tlx. 31 651 461 Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Duchatellier, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 97/13525

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 908 112 A (S. J. PACE) 13 March 1990 cited in the application see column 10, line 21 - line 52 ---	61
A	EP 0 544 969 A (CIBA-GEIGY AG) 9 June 1993 see abstract; figure 1 ---	67
A	EP 0 287 513 A (CIBA-GEIGY AG) 19 October 1988 see abstract; figure 1 ---	1
A	US 5 434 049 A (K. OKANO) 18 July 1995 cited in the application see abstract -----	1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat. Application No.

PCT/US 97/13525

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9305390 A	18-03-93	US 5202010 A	13-04-93
		AU 661241 B	13-07-95
		AU 2640192 A	05-04-93
		CA 2120251 A	18-03-93
		EP 0666980 A	16-08-95
		MX 9204974 A	31-05-94
EP 471949 A	26-02-92	US 5005756 A	04-02-92
		JP 4254752 A	10-09-92
US 5126022 A	30-06-92	AU 637895 B	10-06-93
		AU 7467591 A	18-09-91
		CA 2075969 A	29-08-91
		EP 0521911 A	13-01-93
		JP 8327597 A	13-12-96
		JP 2601595 B	16-04-97
		JP 5504628 T	15-07-93
		WO 9112904 A	05-09-91
US 3533933 A	13-10-70	NONE	
US 4908112 A	13-03-90	NONE	
EP 544969 A	09-06-93	DE 59108591 D	10-04-97
		JP 5302912 A	16-11-93
		US 5296114 A	22-03-94
EP 287513 A	19-10-88	CA 1335805 A	06-06-95
		DE 3876273 A	14-01-93
		DK 191388 A	12-10-88
		FI 97893 B	29-11-96
		HK 192495 A	29-12-95
		IE 62803 B	08-03-95
		JP 2049305 C	25-04-96
		JP 7081987 B	06-09-95
		JP 63263457 A	31-10-88
		PT 87210 B	30-11-93
		US 4971670 A	20-11-90
		US 5082548 A	21-01-92

**Information on paternal family members**

**PCT/US 97/13525**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5434049 A	18-07-95	JP 5236997 A US 5687646 A	17-09-93 04-03-97
-----			

## フロントページの続き

- (72)発明者 スワンソン、ポール・ディ  
アメリカ合衆国92071カリフォルニア州サ  
ンデー、ベル・ガーデンズ・ナンバー8、  
10291番
- (72)発明者 スコット、ブラッドリー・エス  
アメリカ合衆国92122カリフォルニア州サ  
ンディエゴ、チャーマント・ドライブ・ナ  
ンバー1734、7556番
- (72)発明者 ヘラー、マイケル・ジェイ  
アメリカ合衆国92024カリフォルニア州エ  
ンシニタス、ホーク・ビュー・ドライブ  
1614番

## 【要約の続き】

なる電荷－質量比を利用するような方法で操作する。1つの態様において、それらの物質の空間的拡散を低減するような方法で、2つの電極の操作によって選択物質のパンチングを達成する。本発明のもう1つの態様において、垂直配列した試料調製ユニットは上部容器および収集チャンバーを含む。好ましくは、試料を予備調製し、濃縮し、電気泳動をして導電性ポリマーに接触させ、核酸を該導電性ポリマーに向けて移動させ、非目的の物質を該導電性ポリマーから離すように移動させる。細胞選択、精製、複雑度低減および診断を一緒に行なうことができる集積システムを記載する。好ましい具体例において、細胞分離および試料精製を第一の領域で行ない、変性、複雑度低減および診断の工程を第二の領域で行なう。